

Zur chemischen Struktur
der Lithospermsäure
aus *Lithospermum officinale* L.

Dieter Wittmann

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551925_0082

Zur chemischen Struktur der Lithospermsäure

aus Lithospermum officinale L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Dieter Wittmann

aus

München

Januar 1974



Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 1974

Für die Ausführung der physikalisch-chemischen Untersuchungen, sowie für die Unterstützung bei der Interpretation der NMR-Spektren danke ich besonders herzlich Herrn O. Seligmann, Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Schäfer, Max-Planck-Institut für Biochemie München, gilt mein aufrichtiger Dank für die Aufnahme der Massenspektren und die Mithilfe bei der Diskussion.

Weiterhin danke ich Frl. Schild, Max-Planck-Institut für Biochemie München, für die Ausführung der hochauflösenden NMR-Spektren, Herrn Prof. Dr. G. Snatzke, Chemisches Institut der Ruhr-Universität Bochum, für die CD-Daten und Hinweise zur Interpretation und Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Nimz, Karlsruhe, für anregende Diskussionen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
A) Bisnerige Kenntnisse	2
B) Isolierung und Analyse der Substanz LS	7
1) Schmelzpunkt	7
2) pH-Wert und Farbreaktionen	8
3) DC-Überprüfung	8
4) Molekulargewicht, optische Drehung	9
5) IR-Spektrum	10
6) UV-Spektrum	11
7) NMR-Spektrum	15
8) Hydrierung	15
9) Saure Hydrolyse	16
10) Alkalische Hydrolyse	17
11) Trennung der Substanz LS	18
C) Darstellung von Methylprodukten aus LS und deren Trennung	21
D) Untersuchungen der Permethyloprodukte MA und MB und deren Strukturvorschläge	23
1) UV-Spektrum	23
2) IR-Spektrum	23
3) Massenspektrometrie	24
4) NMR-Spektroskopie	29
5) Vorläufige Strukturvorschläge	38
E) Spektroskopische und andere Beweisführungen für die Strukturvorschläge von Substanz MA und MB . .	42
1) Zur NMR-Spektroskopie der β -Phenylmilchsäure .	42
2) Zur Massenspektroskopie der β -Phenylmilchsäure	44

3) Natriummethylathydrolyse der Substanzen MA und MB	45
4) Versuche zur Darstellung eines 4'-Nitroazoben- zolcarbonsäure-(4)-esters aus Substanz 240 . .	49
5) DC-Trennung des Hydrolysegemisches von MA und MB und Untersuchungen der Substanzen 240 und 428	57
a) DC-Trennung	57
b) Zur Struktur der Substanz 240	59
c) Zur Struktur der Substanz 428	60
6) Darstellung und spektroskopische Untersuchun- gen des Dehydrodiferulasäuremethylesters . . .	67
F) Endgültiger Strukturvorschlag für Substanz MB . .	69
G) Endgültiger Strukturvorschlag für Substanz MA . .	73
H) Zur Stereochemie der Substanzen MA und MB	76
Z U S A M M E N F A S S U N G	77
E X P E R I M E N T E L L E R T E I L	
A. Herkunft der Drogen	80
B. Allgemeine Arbeitsmethoden	80
I. Papierchromatographie	80
II. Dünnschichtchromatographie	81
III. Präparative Dünnschichtchromatographie . . .	85
IV. Säulenchromatographie	86
C. Physikalisch-chemische Untersuchungen	87
D. Isolierung von "Substanz LS" und chemische Unter- suchungen	90
I. Isolierung	90
II. Hydrierung	92
III. Hydrolysen	92
IV. Acetylierung	94

V. Methylierung	95
E. Strukturaufklärung der Methylprodukte	96
I. Trennung der Lithospermsäure-Methylprodukte .	96
II. Katalytische Hydrolyse mit Natriummethylat .	99
III. Chromatographische Trennung und massenspektro- metrische Untersuchung der Hydrolyseprodukte	100
IV. Umsetzung der Hydrolyseprodukte mit 4'-Nitro- azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid	101
V. Präparative DC-Trennung der Substanzen 428 und 240	101
F. Isolierung und Darstellung von Vergleichssubstan- zen	103
I. Isolierung der Rosmarinsäure	103
II. Methylierung der Phenylmilchsäure	104
III. Acetylierung des Phenylmilchsäuremethyl- esters	104
IV. Umsetzung von Phenylmilchsäuremethylester mit 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)- chlorid	105
V. Darstellung des Ferulasäuremethylesters . . .	106
VI. Darstellung des Dehydrodiferulasäuredi- methylesters	106
G. CD-Messungen	107

E I N L E I T U N G

Wässrige und methanolische Extrakte der Steinhirse (*Lithospermum officinale* L.) besitzen eine starke antigonadotrope und antithyreotrope und eine schwache blutzuckersenkende Wirkung. In der Volksmedizin sind Kaltwasserauszüge schon früher als Anticoncipiens (*Contraceptivum*) verwendet worden.

Durch Untersuchungen unseres Laboratoriums und anderer Autoren konnte festgestellt werden, daß es sich bei dem Wirkprinzip um eine Phenolcarbonsäure (Lithospermsäure) noch ungeklärter Struktur handelt.

Interessanterweise entfaltete diese Verbindung ihre Aktivität erst nach Oxidation zu einem Oligomerprodukt von ebenfalls noch unbekannter Zusammensetzung. Da die Lithospermsäure zu den pflanzlichen Verbindungen mit der bisher stärksten antihormonellen Wirkung zählt, und möglicherweise als Modell für die Synthese wirksamerer Verbindungen dienen könnte, war es Ziel dieser Arbeit, die Struktur der Lithospermsäure aufzuklären.

ALLGEMEINER TEIL

A) Bisherige Kenntnisse

Die Steinhirse oder der Steinsame, eine zur Familie der Boraginaceen gehörende Pflanze, fand schon im Altertum als Arzneipflanze Verwendung. Zur Anwendung kam damals hauptsächlich der mit einem sehr harten Pericarp versehene Same. Von diesem leitet sich der Name "Steinsame" ab.

In späterer Zeit geriet die Droge wieder in Vergessenheit. Den Anstoß zu einer ersten genaueren pharmakologischen Untersuchung der vorkommenden Lithospermum-Arten gab eine Mitteilung von TRAIN, HENRICHS und ARCHER ¹⁾, die die medizinische Anwendung von Pflanzen bei den Indianerstämmen Nevadas studierten. Die Autoren berichteten, daß ein aus der Wurzel von Lithospermum ruderales Douglas bereiteter Tee bei den Indianerfrauen empfängnisverhütende Wirkung hervorrief, wenn er täglich über sechs Monate lang getrunken wurde.

Diesen Angaben folgend, verfütterte CRANSTON ²⁾ Wurzelextrakte aus Lithospermum ruderales D. an Mäuse und beobachtete bei etwa der Hälfte der untersuchten Tiere das Auftreten von Unfruchtbarkeit. Diese Befunde wurden von ZAHL ³⁾ bestätigt. Anhand seiner Ergebnisse stellte er die Hypothese auf, daß bestimmte Substanzen aus Lithospermum ruderales antihormonelle Wirkungen entfalten und Gonadotropine inaktivieren können. NOBLE, PLUNKETT und TAYLER ⁴⁾ sowie KEMPER ⁵⁾ bestätigten durch Mäuse- und Rattenversuche diese Vermutungen. In weiteren Versuchen konnten NOBLE, PLUNKETT und GRAHAM ^{6/7)} sowie KEMPER ⁵⁾ feststellen, daß in in-vitro- und in in-vivo-Versuchen wässrige Lithospermumextrakte nicht nur die Wirkung des gonadotropen Hormons sondern auch

die des thyreotropen Hormons und Prolactins aufheben. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, ob im in-vivo-Versuch die Bildung der Hormone gehemmt wird, oder bereits gebildetes Hormon in der Blutbahn inaktiviert wird. Hormone des Hypophysen-Hinterlappens sowie adrenocorticotropes Hormon und Insulin werden durch Lithospermum-Extrakte nicht beeinflusst. In ausgedehnten Versuchen fanden LOESER und Mitarb. 8/9/10), daß wässrige Auszüge auch von Lithospermum officinale L. antigonadotrope und antithyreotrope Eigenschaften besitzen.

Interessanterweise beobachteten KEMPER und Mitarb. 11) antigonadotrope und antithyreotrope Wirkung auch bei dem in Nordamerika beheimateten *Lycopus virginicus*. Dieser zählt zur Familie der Labiata, die wiederum innerhalb der Ordnung Tubiflorae sehr nahe mit den Boraginaceen verwandt ist.

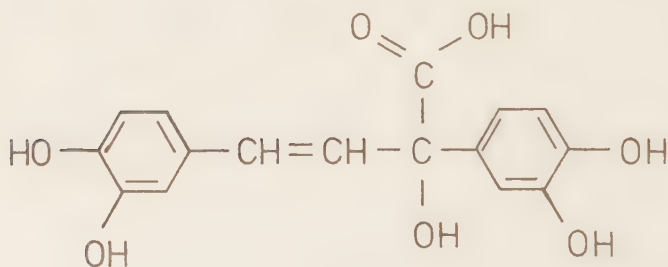
Ob das wirksame Prinzip der beiden Drogen auf einer einzigen Substanz basiert, oder durch ein Gemisch mehrerer Substanzen hervorgerufen wird, ist bislang noch ungeklärt. KEMPER 5) faßte die bisherigen Untersuchungsergebnisse zusammen und kam zu folgendem Schluß:

'Das wirksame Prinzip ist nur durch wässrige Extraktion faßbar, nicht jedoch durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Die Wirksamkeit geht allmählich verloren, wenn man Extrakte über längere Zeit stehen läßt oder sie zum Sieden erhitzt oder wenn das Blattpulver mehrere Stunden der UV-Bestrahlung ausgesetzt ist. Aktivkohle adsorbiert das Wirkprinzip, in wässriger Lösung ist es nur im P_H -Bereich von 5,8 bis 8,5 beständig.'

Die ersten chemischen Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkprinzips stammen von JOHNSON und Mitarb. 12). Diese

isolierten aus *Lithospermum ruderales* D. eine phenolische Substanz, die sogenannte Lithospermsäure, die nach GASSNER und Mitarb. ¹³⁾ selbst zwar nicht biologisch aktiv ist, aber nach Oxidation zu einem Polymerprodukt in in-vivo-Ver-
suchen an Hühnern und infantilen Ratten antigonadotrope Ak-
tivität zeigte.

Aufgrund von UV-, IR- und NMR-spektroskopischen Untersu-
chungen, Elementaranalysen, Farb- und Abbaureaktionen
schlugen JOHNSON und Mitarb. ¹²⁾ für die Lithospermsäure
die Struktur eines 1,3- Bis- 3',4'-Dihydroxyphenyl -1-hy-
droxi-1-carboxipropens (2) vor.



Dieser Strukturvorschlag wurde jedoch von SCHMIECHEN und GIBIAN ¹⁴⁾ in Frage gestellt. Die Autoren synthetisierten das Pentamethylderivat dieses 1,3-Bis- 3',4'-Dihydroxyiphe-
nyl -1-hydroxi-1-carboxipropens (2), fanden aber keine
Übereinstimmung mit dem Methylderivat der "Lithospermsäu-
re".

Nachdem LOESER und Mitarb. ^{8/9/10)} bei Auszügen aus *Lithospermum officinale* L. ebenfalls antigonadotrope und antithyreotrope Wirksamkeit nachgewiesen hatten und aus einer Mitteilung von KEMPER und Mitarb. ¹⁵⁾ hervorgeht, daß wässrige Auszüge aus Blättern von *Lithospermum officinale* wesentlich weniger toxisch sind als Wurzelextrakte aus *Lithospermum ruderales*, wobei der Wirkstoffgehalt der beiden Pflanzenteile im biologischen Versuch gleich sein soll, beschäftigte sich U.W. FRANK ¹⁶⁾ in unserem Arbeitskreis mit den bei uns beheimateten Pflanzen *Lithospermum officinale* und *Lycopus europaeus*.

FRANK bestätigte die Ergebnisse von KEMPER ¹¹⁾, wonach das wirksame Prinzip nur durch wässrige Extraktion gewonnen werden kann. Nachdem im Verlauf seiner Untersuchungen die Aminosäuren der Droge nicht für die antigonadotrope Aktivität in Frage kamen, fand er, daß die wirksamen Drogenauszüge phenolische Substanzen enthalten. Erst durch Oxidation mit einem im Pflanzenmaterial enthaltenen Phenoloxidase-System wurden diese in höhermolekulare, biologisch aktive Polymere umgewandelt. Ferner isolierte er unter Ausschluß von Oxidation eine phenolische Substanz, die selbst pharmakologisch inaktiv war, nach Oxidation jedoch antigonadotrope Wirkung zeigte und mit der von JOHNSON ¹²⁾ isolierten Lithospermsäure identisch war.

Bei diesem Stand der pharmakologischen und chemischen Untersuchungen fanden KEMPER und Mitarb. ¹⁵⁾ in weiterführenden Experimenten mit *Lithospermum officinale*-Extrakten, daß diese neben den bereits beschriebenen antigonadotropen und antithyreotropen Wirkungen zusätzlich noch einen antidiabetischen Effekt lieferten. Durch i.v. Injektion von wässrigen Extrakten erzielten sie einen Abfall der Blutzuckerwerte bei Kaninchen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen BRENNEMAN

und CARMACK ^{17/18)}, die bei in-vitro-Versuchen an Hühnern feststellten, daß Glukagon nach Inkubation mit wässrigen Extrakten aus *Lithospermum* deaktiviert wurde. In einem weitergehenden Versuch chromatographierten die Autoren einen wässrigen Extrakt über Cellulose-Säulen mit Aceton und steigendem Wassergehalt. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, daß zur Deaktivierung von Glukagon nur Fraktionen befähigt waren, die ausschließlich mit Wasser eluiert wurden. Diese Befunde ließen vermuten, daß im wässrigen Extrakt eventuell ein zweites Wirkprinzip vorhanden sein mußte.

Nachdem die neben der Lithospermsäure aus der Droge isolierten Verbindungen: Rutin ¹⁹⁾, β -Sitosterin, Zuckeralkohole ²⁰⁾, Kaffee-, Chlorogen- und Ellagsäure, Catechingerbstoffe, Aminosäuren und ein basisches Peptid ^{21/22)} für die beschriebene antihormonelle Wirkung kaum in Frage kamen und JOHNSON ¹²⁾ ebenso wie FRANK ¹⁶⁾ gefunden hatten, daß die aus *Lithospermum ruderales* bzw. *Lithospermum officinale* isolierte Lithospermsäure durch enzymatische Oxidation in eine pharmakologisch aktive Verbindung umgewandelt wurde, lag es nahe, in der Lithospermsäure das einzige Wirkprinzip der Droge zu vermuten. Bereits FRANK ¹⁶⁾ hatte allerdings festgestellt, daß es sich bei der von ihm aus *Lith. off.* isolierten Phenolcarbonsäure und der Lithospermsäure "JOHNSON" um Gemische handelte.

Ziel vorliegender Arbeit sollte daher sein, die Struktur der Komponenten des Lithospermsäuregemisches zu klären.

B) Isolierung und Analyse der Substanz LS

Die "Substanz LS", die das bisher bekannte Lithospermsäuregemisch darstellt, isolierten wir aus Blatt- und Wurzelmaterial von *Lithospermum officinale* L.. In chromatographischen Vorversuchen konnten wir feststellen, daß Wurzelextrakte wesentlich mehr Substanz LS enthielten als die Blattextrakte. Da die im Drogenmaterial enthaltenen Phenoloxidasen eine schnelle Oxidation bzw. Polymerisation der phenolischen Bestandteile bewirken, arbeiteten wir im sauren Bereich und so weit wie möglich unter Sauerstoffausschluß. Diese Vorsichtsmaßnahmen waren besonders bei Extrakten aus dem an Phenoloxidase reicheren Blattmaterial notwendig. Im übrigen folgten wir der Vorschrift von FRANK ¹⁶⁾. Das Drogenmaterial wurde mit salzsaurem Wasser extrahiert, die wässrige Phase mit Äther ausgeschüttelt, die Ätherphase mit einem Überschuß an Chloroform gefällt und der erhaltene Niederschlag über Cellulose-Säule mit verdünnter Essigsäure getrennt. Wir fraktionierten eine unter dem UV-Licht grau fluoreszierende Zone heraus, schüttelten diese essigsäure Fraktion mit Äther aus und trennten den getrockneten Ätherextrakt erneut über Cellulose. Aus dieser Säule fraktionierten wir eine unter dem UV-Licht dunkelblaugrau fluoreszierende Zone und fällten die mit wenig Äther aufgenommene Substanz mehrmals mit Chloroform. Wir erhielten eine weißgraue Substanz LS, die wir mit der Substanz XS FRANK ¹⁶⁾ und der Lithospermsäure JOHNSON ¹²⁾ vergleichen konnten.

- 1) Der Schmelzpunkt des Substanzgemisches LS lag in Übereinstimmung mit den von FRANK ¹⁶⁾ und JOHNSON ¹²⁾ angegebenen Werten bei 130° (Zersetzung). LS löste sich leicht in Wasser, Methanol, Aceton und Äther und war in Benzol und Chlo-

roform nahezu unlöslich.

2) Die wässrige Lösung von LS reagierte sauer, $\text{PH} \sim 3.0$, und färbte sich mit Eisen-III-chlorid grün. Mit konzentrierter Schwefelsäure gab das Substanzgemisch rote Färbung.

3) Bei der DC-Überprüfung mit den Laufmittelsystemen Toluol-Propanol-Eisessig-Wasser (15:12:10:5) und Chloroform-Eisessig-Wasser (50:45:10) auf Kieselgel G trennte sich unser Substanzgemisch LS ebenso wie die Substanz XS FRANK und authentische Lithospermsäure von JOHNSON in zwei Komponenten auf, in eine sehr breite, blau fluoreszierende Zone mit R_f 0,45 bzw. 0,3 und eine gelb fluoreszierende Zone mit R_f 0,7 bzw. 0,45.

Das Laufmittel Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (5:4:1) trennte die Substanzen in jeweils drei gleiche Komponenten auf, zwei blau fluoreszierende mit R_f 0,08; 0,1 und eine gelb fluoreszierende mit R_f 0,2.

Nach dem Bedampfen mit Ammoniak gingen die blau fluoreszierenden Flecken in die für Polyhydroxizimtsäurederivate typische Grünfärbung über. Eisen-III-chloridlösung färbte die Flecken ebenfalls grün. Diazotierte Sulfanilsäure ergab eine intensive Orangefärbung und Natriumnitrit-Essigsäure-Reagens, mit KOH besprüht, bewirkte Rotfärbung.

Diese und weitere Sprühreagentien bestätigten, wie bereits von FRANK ¹⁶⁾ und JOHNSON ¹²⁾ vermutet, das Vorliegen von mehreren ortho-Dihydroxyphenylgruppierungen. Chlorogensäure, Isochlorogensäure und Cynarin als Vergleichssubstanzen gaben dieselben Farbreaktionen.

Die erhaltene intensive Rotfärbung mit dem Natriumnitrit-Essigsäure-Reagens (HERRMANN ²³⁾) schloß Trihydroxyphenyl-

gruppierungen vom Typ der Gallussäure aus.

Die geringe Eigenfarbe der Substanz und das Ausbleiben von spezifischen Farbreaktionen mit basischer Bleiacetatlösung und Aluminiumchloridlösung sprachen gegen Strukturen vom Flavontyp.

Bereits FRANK ¹⁶⁾ hatte die Möglichkeit von Catechinstrukturen ausgeklammert, da weder mit Vanillin-Salzsäure, noch mit Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens positive Reaktionen erhalten werden konnten.

Die von JOHNSON diskutierte Carboxylgruppe, die FRANK ¹⁶⁾ durch Umsetzung zur Hydroxamsäure und Violett-färbung durch Eisen-III-chloridzusatz nachweisen konnte, gab sich im NMR-Spektrum durch einen Peak bei δ 8,65 zu erkennen.

- 4) Das Molekulargewicht der Substanz LS bestimmten wir auf osmometrischem Wege. Der ermittelte Wert lag mit 682 um das Doppelte höher als er von JOHNSON ¹²⁾ aus dem Neutralisationsäquivalent des Lithospermsäuretetraacetates (318) ermittelt worden war.

FRANK ¹⁶⁾ hatte bei der osmometrischen Bestimmung 694 für das Gemisch XS und 658 für authentische Lithospermsäure erhalten.

Im polarisierten Licht gab unsere Substanz eine Drehung von $[\alpha]_D^{25} = +130^\circ$ (H_2O ; $c = 0,189$). JOHNSON und Mitarb. ¹²⁾ bestimmten $[\alpha] = +122^\circ$, FRANK ¹⁶⁾ $[\alpha] = +135^\circ$.

Obwohl sich auch die von uns neu isolierte Substanz noch als ein Gemisch erwies, zeigten die physikalischen Konstanten, daß eine weitgehende Übereinstimmung bzw. Identität

mit den früher beschriebenen Stoffen bestand. Da die quantitative Trennung des Gemisches wegen der sich chromatographisch kaum unterscheidenden zwei bis drei Komponenten zunächst nicht gelang, war das Vorliegen eines Stereoisomergemisches wahrscheinlich. Aus diesen Gründen führten wir unsere ersten Versuche zunächst mit dem Substanzgemisch LS durch.

Für die Vergleichsuntersuchungen wählten wir Zimtsäureabkömmlinge, insbesondere Chlorogensäure, Isochlorogensäure, Cynarin und Rosmarinsäure, da bereits FRANK¹⁶⁾ aufgrund von spektroskopischen Untersuchungen auf eine enge chemische Verwandtschaft seiner Substanz XS zu Isochlorogensäure hingewiesen hatte.

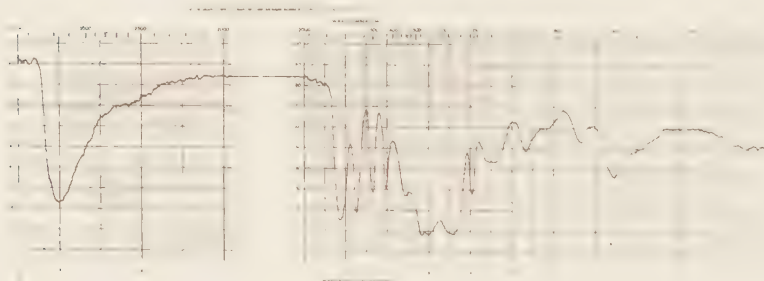


Abb. Nr. 1
IR-Spektrum der Substanz LS

- 7) Das IR-Spektrum von LS stimmte ebenfalls mit dem IR-Spektrum der Substanz XS FRANK¹⁶⁾ und mit dem der Litnospermsäure von JOHNSON¹²⁾ überein. Neben einer Reihe bereits von FRANK¹⁶⁾ interpretierter Banden findet man im Spektrum

deutlich eine breite OH-Bande bei 3356 cm^{-1} und zwei Carbonyl-Banden bei 1695 cm^{-1} bzw. 1708 . Die Aromaten-Banden bei 1513 cm^{-1} und 1597 cm^{-1} und eine trans-Doppelbindungsbande, durch Konjugation zum Ring nach 975 cm^{-1} verschoben, sind deutlich ausgeprägt. Der Befund FRANKS, daß sich das LS-Spektrum fast vollständig mit dem der Isochlorogensäure deckt, legte die Vermutung nahe, daß die Substanz LS typische Strukturelemente der Isochlorogensäure aufweist.

Nach neueren Untersuchungen von SCARPATI, GUIZO ²⁵⁾ und CORSE, LUNDIN und WEISS ²⁴⁾ stellt die Isochlorogensäure ein Substanzgemisch aus 4,5-, 3,4- und 3,5-Dicaffeylchinasäure dar. Darüberhinaus sind in der Zwischenzeit noch die Neochlorogensäure, die "Bande 510" (Caffeyl-5-chinasäure und Caffeyl-4-chinasäure) und Cynarin (1,4-Dicaffeylchinasäure) natürlich vorkommend aufgefunden worden.

- 6) Das UV-Spektrum des Substanzgemisches LS zeigt eine, für Zimtsäurederivate nicht typische Folge von Absorptionsmaxima. Diese liegen bei 255 nm , 288 nm und 308 nm neben einer Schulter bei 340 nm . (Abb. Nr. 2, Seite 12.)



Abb. Nr. 2
UV-Spektrum der Substanz LS

Obwohl aus den Ergebnissen von JOHNSON ¹²⁾ und FRANK ¹⁶⁾ sowie aus dem IR-Spektrum hervorgeht, daß die Lithosperm-säure unter anderem das Strukturelement einer Zimtsäurekor-porente enthalten muß, ist das für Polyhydroxi-Zimtsäurede-riivate charakteristische Maximum zwischen 315 nm und 330 nm (HERRMANN ²⁶⁾) im Spektrum des Lithospermsäuregemisches hypsochrom nach 306 nm verschoben ($E \frac{1}{1 \text{ cm}} \approx 2450$). Nach PATTERSON und HIBBERT ²⁷⁾ geben Vanillyl- und Veratrylderi-

vate, die mit einer Olefin- oder Carbonylgruppe in Konjugation stehen, eine Absorptionsbande bei 310 nm. Allerdings besitzen diese Verbindungen keinen typischen Zimtsäurecharakter mehr. Offenbar ist der Konjugationseffekt in der Zimtsäuregruppierung der Lithospermsäure durch weitere Bindungen so abgeschwächt, daß eine hypsochrome Verschiebung um $\Delta = 12$ nm resultiert.

Andererseits ist die bei der Lithospermsäure deutlich ausgeprägte UV-Bande bei 288 nm ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 2800$) bei den Zimtsäurederivaten nicht üblich oder, wie bei den Chlorogensäurederivaten, nur als schwache Schulter vertreten. Lediglich das Spektrum der Rosmarinsäure ²⁸⁾ (Abb. 3), ein Depsid aus Kaffeesäure und α -Hydroxihydrokaffeesäure, fällt durch eine zusätzliche starke Absorptionsbande bei 285 nm auf. HERRMANN ²⁹⁾ beschreibt eine Dihydrokaffeesäure und eine Dehydrodiferulasäure, die ebenfalls eine UV-Absorptionsbande bei 285 nm ausbilden.

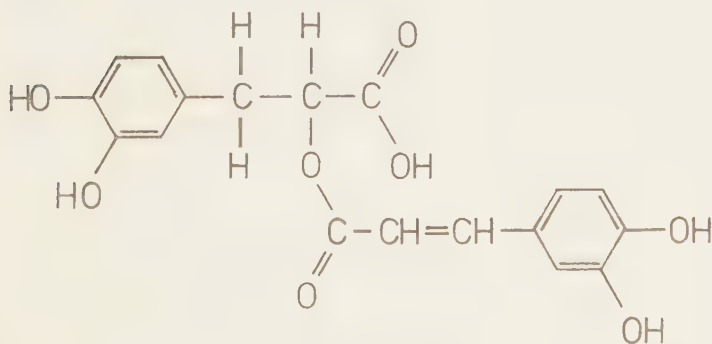


Abb. Nr. 3
Rosmarinsäure

Durch die optische Ähnlichkeit der Spektren der Rosmarinsäure und der Lithospermsäure und die Tatsache, daß neben den für Zimtsäuren charakteristischen Absorptionsbanden eine weitere UV-Bande bei 285 nm auftritt, kann man für die Lithospermsäure neben dem Zimtsäurechromophor ein weiteres Strukturelement z.B. das einer hydrierten Kaffeesäure postulieren.

Nach Hydrierung der Substanz LS erscheint im Spektrum nur noch eine starke Absorptionsbande im Bereich von 283 nm. Diese Tatsache spricht ebenfalls dafür, daß in der Lithospermsäure das Strukturelement einer hydrierten Kaffeesäure enthalten sein muß.

Natriumacetatzusatz zur methanolischen Lösung der Lithospermsäure bewirkte eine hypsochrome Verschiebung der Bande 288 nm um ca. 8 nm nach kürzeren Wellenlängen, während die Bande bei 308 nm stark bathochrom verschoben wurde.

Na-acetatzusatz zur methanolischen Lösung von Rosmarinsäure bewirkte ebenfalls eine hypsochrome Verschiebung der kurzwelligen Bande bei 285 nm um 8 nm und eine bathochrome Verschiebung der Bande bei 325 nm nach 335 nm, während die Absorptionsbanden der Chlorogensäure, Isochlorogensäure und des Cynarins allgemein nur nach längeren Wellenlängen verschoben wurden.

Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß in der Lithospermsäure das Maximum bei ca. 285 nm einem zweiten chromophoren System zugehört.

Die bathochrome Verschiebung der Absorptionsbanden auf Zusatz von Natriummethylat ist durch die Bildung von Phenolationen zu erklären. (JURD ³⁰), BÜHME u. SEVERIN ³¹).

- 7) Das 100 MHz-NMR-Spektrum der in DMSO gelösten Substanz LS zeigt ein Multiplett im Bereich von $\delta = 2,95$, ein Multiplett bei $\delta = 4,35$, ein scharfes Triplet bei $\delta = 5,05$, zwei Dublette bei $\delta = 5,7$ und $\delta = 5,8$ mit der Kopplungskonstanten $J = 16$ Hz, Multiplette im Bereich von $\delta = 6,2 - 7,4$, zwei Dublette bei $\delta = 7,6$ und $7,7$ mit der Kopplungskonstanten $J = 16$ Hz, ein Säuresignal bei $\delta = 8,7$ und ein OH-Signal bei $\delta = 8,9$.

Die Zuordnung ergibt das Vorhandensein mehrerer aromatischer Systeme ($\delta = 6,2 - 7,4$), zwei trans-Äthylen-Strukturen in Konjugation zu einem Ring (Dublette bei $\delta = 5,7 / 5,8$ und $\delta = 7,6 / 7,7$ mit der Kopplungskonstanten 16 Hz) sowie Carboxyl- und OH-Gruppen. Methoxigruppen fehlen. Ein Multiplett bei $\delta = 2,9$ könnte einer CH_2 -Gruppe zugeordnet werden.

Ein Vergleich mit NMR-Spektren mehrerer von CORSE³²⁾ untersuchter Caffe-ylchinasäuren läßt im Bereich der für die Chinasäure charakteristischen Signale keine Übereinstimmung erkennen.

Das NMR-Spektrum der Rosmarinsäure (GSTIRNER³³⁾) zeigt mit ihren Multipletten bei $\delta = 3,05$ und $\delta = 5,1$, den aromatischen Signalen und der 16 Hz-Kopplung für die Dublette bei $\delta = 6,25$ und $\delta = 7,5$ (Vinyl-Protonen mit trans-Konfiguration) eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Spektrum von LS, doch lassen die Signale in den anderen Frequenzbereichen namentlich die bei $\delta = 4,3$ und $\delta = 5,7$ deutlich andere Strukturelemente erkennen.

- 8) Eine mehrstündige Hydrierung von LS mittels H_2 -Palladiumkohle lieferte ein Produkt, das chromatographisch auf Kieselgel im Laufmittelsystem Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (20:70:10) unter dem UV-Licht (365 nm) nur einen einzigen gelb fluoreszierenden Flecken (R_f 0,6) ergab. Im kurzwelligeren UV-Licht (254 nm) erschienen zwei weitere Flecke mit R_f

0,38 / 0,26 (Fluoreszenzminderung). Mit Eisen-III-chlorid-Lösung besprüht, verfärbten sich diese beiden Flecke wesentlich intensiver von graugrün nach graudunkelviolett als die nicht hydrierten entsprechenden LS-Flecke.

Bei einem DC-Vergleich mit Substanz LS stellten wir fest, daß die beiden hydrierten Verbindungen im Chromatogramm um 0,07 Rf-Einheiten tiefer lagen. Die gelb fluoreszierende Substanz wurde nicht verändert.

Die eluierten beiden Hydrierungsprodukte ergaben im UV-Spektrum wie die α -Hydroxi-Hydrokaffeensäure jeweils nur noch eine Absorptionsbande bei 284 nm.

Der Versuch, das hydrierte Substanzgemisch präparativ in dem oben genannten Fließmittel über Kieselgel-Säulen zu trennen, war erfolglos.

- 9) Bei der sauren Hydrolyse der Substanz LS mit 0,1 n H_2SO_4 (3 Stunden, 100°) entstand weder Kaffeesäure noch Chinasäure. Im DC- und PC-Chromatogramm konnten neben unveränderter Substanz LS nur ein oranger Fleck (Rf 0,78) und ein stark gelb fluoreszierender Fleck (Rf 0,85) nachgewiesen werden. Diese lagen zwar ungefähr in Höhe der Kaffeesäure, gaben mit spezifischen Sprühreagentien o-Dihydroxyphenol-Reaktion, hatten selbst aber eine vollkommen andere Eigenfluoreszenz.

Parallele Hydrolyseversuche mit Chlorogensäure und Rosmarinsäure ergaben eindeutig Kaffeesäure. Im "Chlorogensäure-Chromatogramm" konnten wir neben unveränderter Chlorogensäure einwandfrei die Chinasäure durch Besprühen mit Ninhydrin-Reagens (WIGGINS und WILLIAMS ³⁴) und Morin-Lösung (NEU ³⁵) nachweisen. Im Chromatogramm der Rosmarinsäure fanden wir neben Kaffeesäure nach Besprühen mit H_2SO_4 konz. und Erhitzen auf 110° einen weiteren sich schwarz färbenden Fleck, der der α -Hydroxihydrokaffeensäure zugeordnet wer-

den könnte.

Auch nach Hydrolyse der Substanz LS mit 5 n H_2SO_4 (3 Stunden, 70°) konnten in keinem Falle weder Kaffeesäure noch Chinasäure nachgewiesen werden.

Wie RAUSCHER, VOIGT und SCHMITT ³⁶⁾ berichteten, verändert sich Kaffeesäure schon unter milden Hydrolysebedingungen mit 0,1 n H_2SO_4 . Nach dreistündiger Hydrolyse bei 100° identifizierten sie neben Kaffeesäure noch weitere zwei Flecke.

Weitere Hydrolysen von LS mit 1 n HCl und 5 n HCl ergaben zwar jeweils ein leicht verändertes chromatographisches Bild, jedoch gelang es in keinem Fall, Chlorogensäurespaltprodukte zu identifizieren.

Auch diese Hydrolysebefunde sprachen für eine chemische Verwandtschaft von Substanz LS mit den zum Vergleich herangezogenen Phenolcarbonsäuren, doch schied ein direkter Chlorogensäureabkömmling aus.

- 10) Die alkalische Hydrolyse mit 0,1 n KOH wurde, um Polymerisationsvorgänge weitgehend zu verhindern, unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Dabei fiel auf, daß sich die Lösung schnell intensiv gelb färbte, nach kurzer Zeit in eine rötliche und dann in eine intensiv rote Färbung überging. Beim Neutralisieren der alkalischen Lösung wechselte die Farbe nach orange und ging im sauren Milieu in Gelbfärbung über.

Bei der DC-Prüfung der Äther- und Äthylacetatausschüttelungen waren weder Kaffeesäure noch eine der anderen bekannten Säuren wie Ferulasäure, Protocatechusäure, Veratrumsäure, Hydrozimtsäure, Vanillinsäure, Resorcylsäure und Phenole wie Protocatechualdehyd oder Brenzcatechin nachzuweisen.

Die entstandenen Flecke gaben aber wiederum die o-Dihydroxiphenylreaktion. Diese Ergebnisse bestätigen ebenfalls die Abwesenheit eines Chlorogensäurekörpers in LS.

11) Versuche zur Trennung des Substanzgemisches LS

Nach dem Ergebnis der bisherigen Untersuchungen schien ein Fortschritt in der Strukturaufklärung nur durch die Herstellung reiner Verbindungen erreichbar. Die orientierenden Vorversuche wurden zunächst dünnschichtchromatographisch zusammen mit Chlorogensäure, und Isochlorogensäure, die nach SCARPATI und GUIZO ²⁵⁾ ein Gemisch aus drei Komponenten darstellt, als Testgemisch durchgeführt. Während wir mit Cellulose- und Polyamid-Platten keine befriedigenden Trennergebnisse erhalten konnten, gelang auf Kieselgelplatten mit den Fließmitteln Chloroform-Eisessig-Wasser (50:45:10), Chloroform-Äthylformiat-Ameisensäure (20:75:5) und Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (20:70:10) eine Trennung von LS in drei Zonen.

Die unteren zwei der drei Zonen, die jeweils relativ dicht beieinander lagen, zeigten immer gleiches Verhalten. Sie fluoreszierten im UV-Licht (365 nm) dunkelblau, gaben bei 254 nm Fluoreszenzminderung, verfärbten sich nach kurzer Zeit am Tageslicht auf Kieselgelplatten bräunlich, nach HEHRMANN ³⁷⁾ ein Hinweis auf o-Dihydroxiphenylgruppierungen, und zeigten mit den verwendeten Sprühmittelreagentien jeweils gleichartige Färbung. Die dritte Zone dagegen zeigte im UV-Licht keine Fluoreszenzminderung, sondern eine gelbliche Fluoreszenz.

Versuche der Trennung an sauer imprägnierten Kieselgel-schichten nach SCARPATI ³⁸⁾ (2 n KHSO_4 ; 1 n H_2SO_4) bzw. mit Mineralsäurehaltigen Fließmitteln, führten zu keinem Ergebnis.

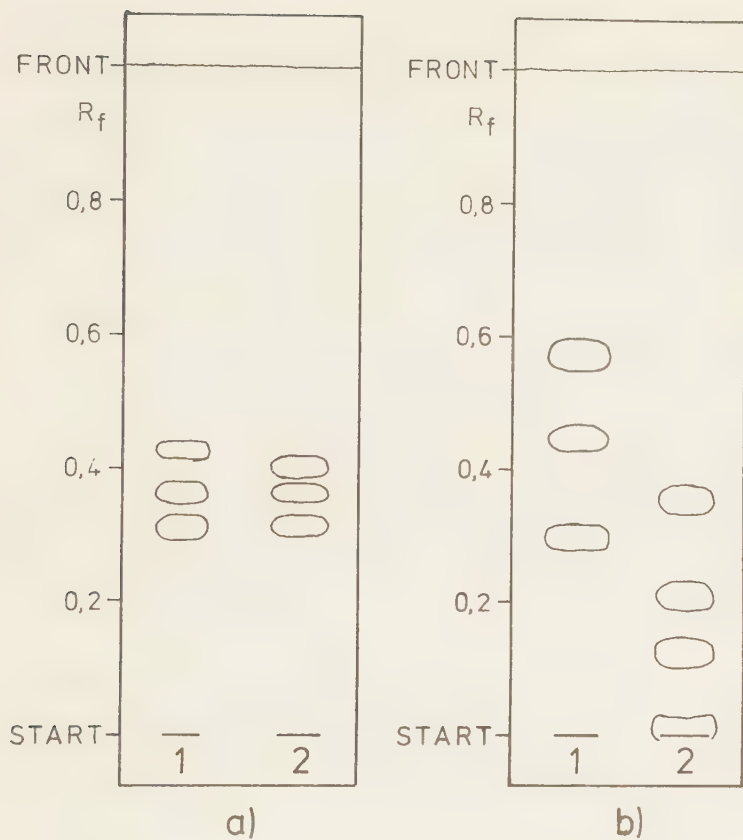


Abb. 4

Dünnschichtchromatographie: 1 = Substanz LS
2 = Isochlorogensäure

Kieselgelfertigplatten Merck 60

Laufmittel: a) Chloroform-Eisessig-Wasser (50:45:10)

b) Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (20:70:10)

Bei dem Versuch einer Trennung über Kieselgelsäulen mit dem modifizierten Elutionssystem Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (30:60:10) konnten wir zwar unter dem UV-Licht eine gelbe und zwei darüberliegende stark dunkelblaue Zonen (LSA und LSB) erkennen, die aufgefangenen Fraktionen bestanden jedoch nach DC-Überprüfung immer aus Gemischen von mindestens zwei Substanzen.

Versuche zur Kristallisation der Substanzen LSA und LSB aus den angereicherten Fraktionen schlugen fehl.

Nunmehr versuchten wir das Gemisch LS durch präparative DC zu trennen. Nach einer Reihe von Vorversuchen mit selbstgestrichenen und handelsüblichen DC-Platten gelang eine befriedigende Trennung auf Kieselgelfertigplatten der Fa. Woelm ohne Indikatorzusatz. Wir erhielten allerdings nur wenige Milligramm der Substanzen LSA und LSB, die mit Polymeranteil verunreinigt waren.

LSA und LSB gaben dasselbe UV-Spektrum wie die Ausgangssubstanz LS.

Den Schmelzpunkt für die über DC-Platten getrennte Substanz LSA ermittelten wir zu 250° (Zersetzung), für die Substanz LSB zu 210° (Zersetzung).

C) Darstellung von Methylprodukten aus LS und deren Trennung

Nachdem Acetylierungsversuche nur zu schwer trennbaren Gemischen führten, versuchten wir die Darstellung von Methyläthern.

Die Veresterungsversuche von LSA und LSB mit Methanol-Salzsäure gaben jedoch nur sehr wenig Ausbeute.

Bei der Methylierung mit Diazomethan entstanden aus LSA und LSB fast nur partielle Methylprodukte, obwohl PECHMANN ⁴⁰⁾ Diazomethan als vorzügliches Methylierungsmittel für empfindliche Phenole beschreibt. Über ähnliche Schwierigkeiten berichteten HERZIG u. WENZEL ⁴¹⁾. Die Autoren fanden, daß eine Hydroxigruppe in o-Stellung zu einer Carboxylgruppe mit Diazomethan nicht methyliert wird. CASERIA, ROBERTS, NEWMAN u. JOHNSON ⁴²⁾ erhielten bei der Methylierung von Pyrogallolcarbonsäure mit diesem Reagens nur ein 2-Hydroxi, 3,4-Dimethoxiderivat.

Die Methylierung des LS-Gemisches mit Diazomethan lieferte u.a. dieselben zwei, kräftig blau fluoreszierenden Permethylylprodukte, die bei der Methylierung von LSA und LSB entstanden waren.

Versuche der säulenchromatographischen Trennung dieses Gemisches gaben wegen der großen Zahl partieller Methylprodukte nur unreine Fraktionen.

Die besten Erfahrungen machten wir mit der Dimethylsulfatmethode nach CATES ⁴³⁾ und MEHTA u. SESHADRI ⁴⁴⁾ in Aceton und frisch geglühtem Kaliumcarbonat, einem der Claisen'schen Carbonatmethode ⁴⁵⁾ nachgebildeten Verfahren. Wir erhielten einen gelben Sirup, der sich auf Kieselgelfolie mit Benzol-Äthylacetat (6:5) in sechs Flecke auftrennte, zwei

stark blau fluoreszierende Flecke (R_f 0,45 / 0,63) neben einem hellblau fluoreszierenden Fleck (R_f 0,3) sowie drei gelbbraun fluoreszierende Flecke (R_f 0,48, 0,52/0,70). Während zwei der gelbbraunen Flecke mit Phenolreagentien leicht positive Reaktion gaben, reagierte der dritte intensiv gelb fluoreszierende Fleck (R_f 0,7) mit diesen Reagentien nicht. Die beiden stark blau fluoreszierenden Flecke, die ebenfalls keine Phenol-Reaktion gaben, stimmten im Vergleichschromatogramm mit den aus der Methylierung mit Diazomethan von LSA, LSB und LS erhaltenen blau fluoreszierenden Substanzen in R_f -Höhe und Färbung überein. Demnach sollte es sich bei diesen beiden um die Permethylylprodukte handeln.

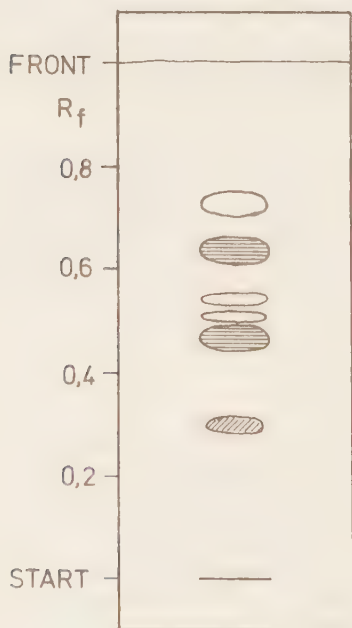


Abb. 5
Dünnschichtchromatogramm der Methylprodukte
Kieselgelfertigfolie
MN Polygram
Laufmittel: Benzol-
Äthylacetat 6:5

Die Trennung und Reinigung der beiden Hauptprodukte gelang über eine Polyamid-Säule mit dem Laufmittel Methanol-Wasser (75:25), sowie über eine weitere säulenchromatographische Trennung an Kieselgel mit dem Elutionssystem Benzol-Äthylacetat (7:3). Wir erhielten zwei weiß-gelbliche Substanzen, die wir als MA und MB bezeichneten. Sie waren trotz mehrfacher Kristallisationsversuche aus verschiedenen Lösungsmitteln nicht kristallin zu erhalten.

D) Untersuchungen der Permethylprodukte MA und MB und deren Strukturvorschläge

Die Methylprodukte wurden auf Kieselgel, Cellulose und Polyamidplatten chromatographiert und mit Phenol-Reagentien besprüht. Wir erhielten jeweils einen einheitlichen Fleck, der keine positive Phenolreaktion mehr gab. Nach dem Ergebnis dieser chromatographischen Versuche mußten beide Substanzen voll methyliert und rein sein.

Beide Verbindungen schmolzen bei 55° . Sie waren optisch aktiv, drehten aber verschieden stark rechts (MA: = $+118^{\circ}$; MB: = $+76^{\circ}$ Lösungsmittel: Chloroform). Substanz MA gab nach Mikro-Zeisel 22,8 % Methoxyl, Substanz MB 23,2 % Methoxyl.

- 1) Die UV-Spektren von MA und MB hatten übereinstimmend die Absorptionsmaxima bei 228 nm, 285 nm, 305 nm und zwei Schultern bei 252 nm und 340 nm.
- 2) Die IR-Spektren der zwei Substanzen MA und MB waren nahezu deckungsgleich.

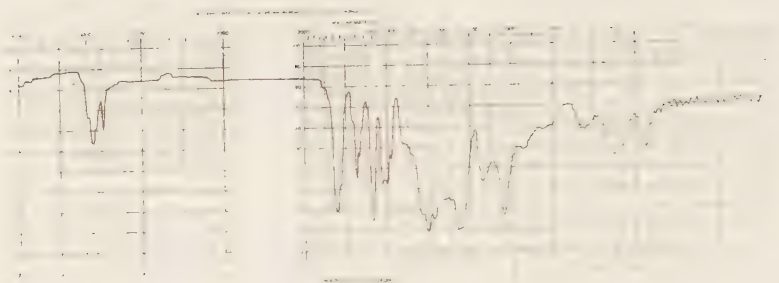


Abb. Nr. 6
IR-Spektrum der Substanz MA

Das Fehlen einer Absorptionsbande bei 3500 cm^{-1} spricht für die Vollmethylierung der Substanzen. Anstelle einer breiten OH-Bande ist deutlich die trans C = C - Doppelbindungsbande bei 3010 cm^{-1} zu erkennen. Die Carbonylbande ist gegenüber LS nach höheren Wellenlängen (1730 cm^{-1}) verschoben. Die Aufspaltung in zwei bis drei Banden deutet auf mehrere Carbonyl-Gruppen in unterschiedlicher Lage hin. Zwei stark ausgeprägte Banden bei 1076 cm^{-1} und 1020 cm^{-1} stammen vermutlich von den Valenzschwingungen einer Äthergruppe in Konjugation zu einer C = C - Doppelbindung.

3) Massenspektroskopie

Die Substanz MA unterschied sich von MB nur im oberen Massenbereich durch drei zusätzliche Signale. Die sonstige Fragmentierung war nahezu gleich. Die anfänglich angenomme-

nen Molekülsignale m/e 414 für Substanz MA und m/e 428 für MB paßten nicht auf den von JOHNSON ¹²⁾ angegebenen Wert von 318 für das Molekulargewicht der nicht methylierten Lithospermsäure. Von den beiden intensivsten Signalen m/e 222 und m/e 151 konnte zunächst nur das Schlüsselbruchstück m/e 151 dem Dimethoxiderivat des bekannten Tropyliumions m/e 91 zugeordnet werden.

Nach zweimaliger Reinigung von Substanz MA ergab diese den neuen Peak m/e 636. Zwischen dem Signal m/e 636 und dem nächstniedrigeren, schon bekannten Signal (m/e 414), traten mit Ausnahme von zwei schwachen Peaks bei M-31 und M-49 keine weiteren m/e -Werte mehr auf. M-31 und M-49 stammten von einer OCH_3 - bzw. $COOCH_3$ -Eliminierung. Das Auftreten von M-31 beweist, daß es sich bei dem Signal m/e 636 um den Molekülpeak der Substanz MA handeln muß.

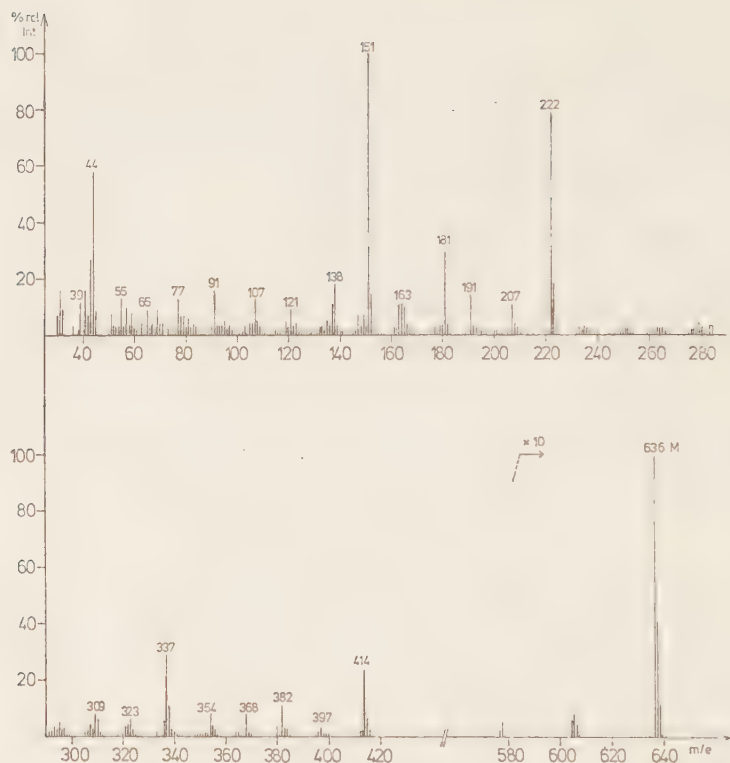


Abb. Nr. 7
M-Spektrum der Substanz MA (636)

Dieser Wert (3) war doppelt so groß wie das von JOHNSON¹²⁾ für seine Lithospermsäure berechnete Molekulargewicht von 318. Allerdings hatte JOHNSON das Molekulargewicht der

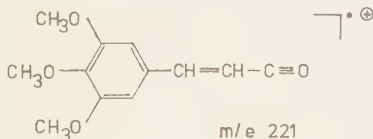
freien Phenolcarbonsäure berechnet. Aber auch unser osmometrisch gemessener Wert von 682 für das nicht methylierte Gemisch LS stimmte mit dem massenspektroskopisch ermittelten Wert 636 für MA nicht überein.

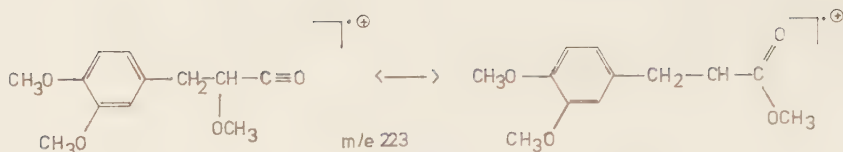
Das Spektrum der ebenfalls gereinigten Substanz MB zeigte im Bereich zwischen m/e 604 und m/e 650 mehrere Signale, die wir zunächst nicht zuordnen konnten.

Ebenso wie im Spektrum von MA überraschte auch hier, daß zwischen m/e 428 und m/e 604 keine weiteren Signale mehr auftraten.

Eindeutig und auffällig war bei sämtlichen Spektren der Zerfall von 636 nach 414, der durch das Auftreten des dazugehörigen metastabilen Peaks m/e 636 $\rightarrow$ 414 = 269 gesichert war. Daneben trat als intensivstes Signal der Peak bei m/e 222 auf. Eine Stelle in MA bzw. MB muß demzufolge sehr labil sein, da das Molekül nahezu quantitativ in die zwei Bruchstücke m/e 222 und m/e 414 zerfällt. Diese unterliegen ihrerseits der weiteren massenspektrometrischen Fragmentierung.

Über den Massenpeak bei m/e 222 ließen sich nur aus Vergleichen mit M - Spektren von Zimtsäurederivaten und dem M- Spektrum der Rosmarinsäure Schlüsse ziehen. So liefern zum Beispiel die Methylprodukte der Trihydroxizimtsäure und α -Hydroxyhydrokaffeesäure Massenzahlen von m/e 221 und m/e 223.



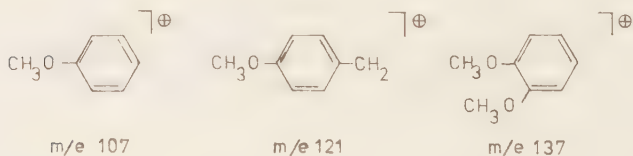


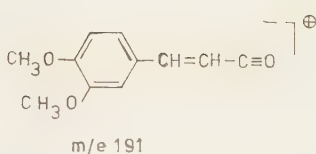
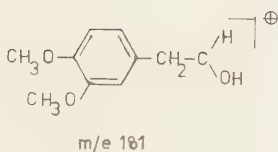
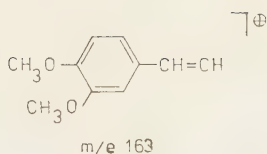
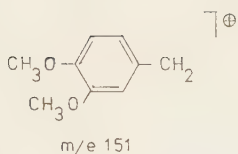
Über den Peak m/e 414 waren vorerst keine Aussagen möglich. Im niederen Massenbereich wurden fast ausschließlich Signale aus der Fragmentierung von Zimtsäurederivaten beobachtet. Diese unterliegen nach KIENITZ ⁴⁶⁾ im substituierten wie im nicht substituierten Zustand etwa der gleichen Fragmentierung.

Die nachgewiesenen Schlüsselbruchstücke konnten wie folgt zugeordnet werden:

m/e 39 : $C_3H_3^+$ ⁴⁷⁾ und m/e 51 : $C_4H_3^+$ stellen charakteristische Benzolringbruchstücke dar. Das Signal m/e 65 ($C_5H_5^+$) kennzeichnet Aromaten mit einer Seitenkette. m/e 77 ($C_6H_5^+$) ist typisch für monosubstituierte Benzolderivate mit einem elektronenziehenden Substituenten. Das Signal m/e 91 ($C_7H_7^+$) kennzeichnet das Tropyliumion, das für alkylsubstituierte Aromaten charakteristisch ist. ⁴⁸⁾

Im Massenbereich zwischen m/e 100 und m/e 200 finden sich Signale von Fragmenten methylierter Zimtsäurederivate. Diese wären folgenden Strukturen zuzuordnen ⁴⁹⁾:





Außerdem fanden wir im unteren Massenbereich eine Reihe doppelt positiv geladener Ionen, die halbe Massenzahlen aufwiesen. Nach SPITTELLER ⁵⁰⁾ sind diese charakteristisch für Aromaten und Heterozyklen. Sie kommen in den Spektren aliphatischer, gesättigter Verbindungen praktisch nicht vor, da die Energie zur Spaltung der aliphatischen Verbindungen wesentlich niedriger ist, als zur weiteren Abspaltung eines σ -Elektrons nötig wäre.

4) NMR-Spektroskopie

Weitere Informationen waren ohne nähere Strukturkenntnisse zu diesem Zeitpunkt aus dem Massenspektrum nicht zu erhalten. Zusätzliche Strukturinformationen sollte die NMR-Spektroskopie bringen.

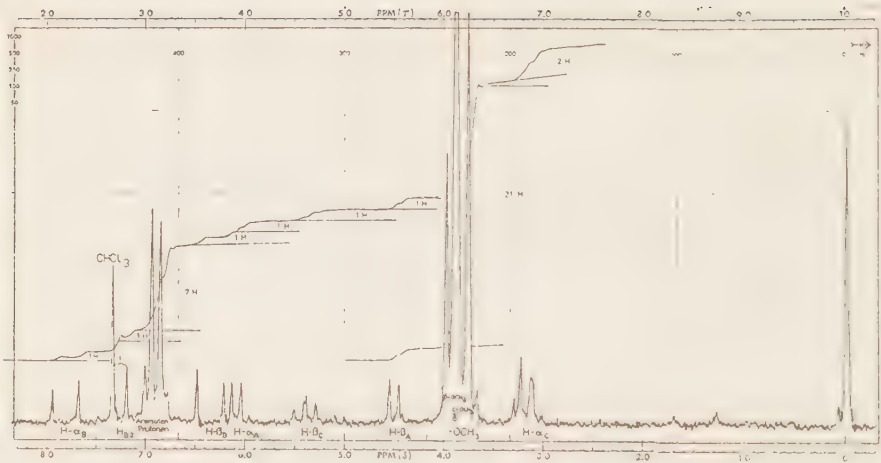


Abb. Nr. 8
NMR-Spektrum der Substanz MA
(Endgültiger Strukturvorschlag S.75)

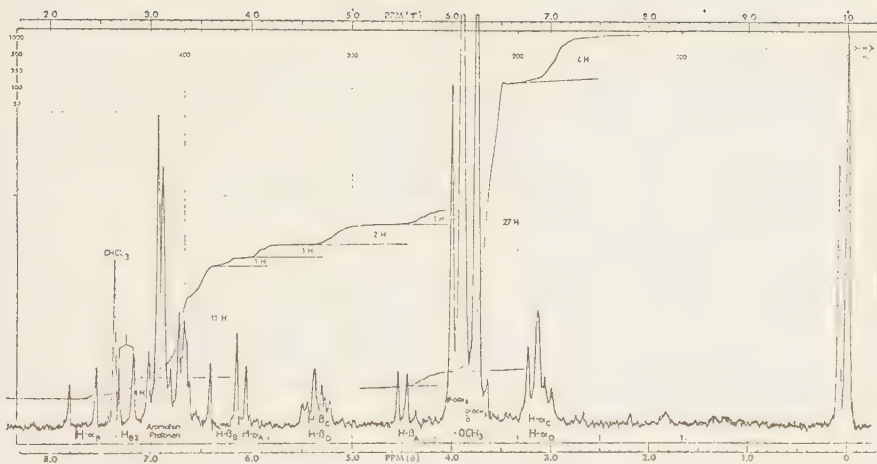


Abb. Nr. 9
NMR-Spektrum der Substanz MB
(Endgültiger Strukturvorschlag S.72)

Die Methylverbindungen MA und MB gaben im 60 MHz-Spektrum nahezu identische Protonensignale. Sie differierten nur im aromatischen Bereich. Die Integration ergab für Substanz MB drei aromatische Protonen mehr als für Substanz MA. Dafür enthielt MA zwei Methoxigruppen mehr als MB. Damit waren frühere Vermutungen, daß zwei stereoisomere Substanzen vorliegen könnten, widerlegt.

In Übereinstimmung mit dem NMR-Spektrum des nicht methylierten Ausgangsgemisches LS fanden wir in beiden Spektren

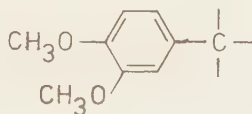
neben einem Aromatenmultiplett (Zentrum ca. $\delta = 6,9$) bei $\delta = 6,3$ und $\delta = 7,74$ zwei Dublette mit der Kopplungskonstanten 16 Hz. Sie integrierten für jeweils ein Proton und waren den in α - und β -Stellung zum Benzolring stehenden Vinylprotonen zuzuordnen. Die 16 Hz-Kopplung spricht eindeutig für eine trans-Stellung der Vinylprotonen. Im Spektrum von MB lagen die gleichen Signale etwas paramagnetisch verschoben bei $\delta = 6,28$ und $\delta = 7,68$. Aus der Integration ergab sich ebenfalls je ein Proton. Damit steht jeweils eine Zimtsäureeinheit als Strukturelement von Substanz MA und MB fest.

Die aromatischen Multiplette im Bereich von $\delta = 6,5$ bis $\delta = 7,5$ sind bei beiden Substanzen etwas verschieden ausgebildet. Eine genaue Zuordnung war wegen ihrer Komplexität nicht möglich. Die Integration ergab für Substanz MA 8 und für MB 11 Protonen.

Neben zwei Dubletten bei $\delta = 4,5$ und $\delta = 6,1$ und zwei Multipletten bei $\delta = 5,33$ und $\delta = 3,15$, lagen im Bereich von $\delta = 3,5$ bis $\delta = 4,2$ mehrere Methylsignale. Aus der Integration errechneten sich für Substanz MA 7 und für MB 9 Methylgruppen.

Auffallend war die Aufspaltung dieser Methylprotonen in drei Signale bei $\delta = 3,99$, $\delta = 3,88$ und $\delta = 3,75$ mit unterschiedlicher Intensität. Bei Substanz MA betrug das Verhältnis 1:4:2, bei Substanz MB 1:6:2. Da neben aromatischen Methoxigruppen im Molekül auch Methylestergruppierungen vorliegen mußten, waren neben vier bzw. sechs gleichwertigen Methoxigruppen pro Molekül entweder eine Methylestergruppierung und zwei gleichartige Methoxigruppierungen in besonderer Stellung, oder zwei Methylestergruppierungen und eine abweichend davon angeordnete Methoxigruppe zu diskutieren.

Da Substanz MB im Gegensatz zu MA zwei Methoxigruppen mehr enthält und aus der Integration der aromatischen Protonen hervorgeht, daß MB drei aromatische Protonen mehr besitzt kann man für MB außer dem Zimtsäureanteil ein Strukturelement der Formel



und die Anwesenheit von ein bis zwei weiteren Aromaten postulieren.

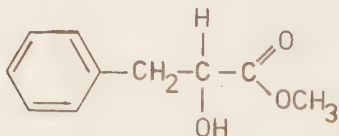
Durch Entkopplung der beiden 16 Hz-Dublette bei $\delta = 6,3$ und $\delta = 7,74$ war die Zimtsäurestruktur eindeutig bewiesen. Die Kopplung der beiden Dublette bei $\delta = 6,1$ und $\delta = 4,5$ sowie die der beiden Multiplette bei $\delta = 5,35$ und $\delta = 3,15$ konnten ebenfalls durch Entkopplung bewiesen werden. Damit war gleichzeitig klar, daß die Protonen der beiden 5,5 Hz-Dublette sowie die der beiden Multiplette ($\delta = 5,35$ und $\delta = 3,15$) getrennten Systemen zugehören und keine weiteren Protonen als Nachbarn haben können. Daraus ergibt sich, daß in MA und MB außer der Zimtsäure zwei weitere Strukturanteile übereinstimmend vorkommen.

Da sich für MA wie für MB aus der Integration der beiden Dublette $\delta = 6,1$ und $\delta = 4,5$ ($J = 5,5$ Hz) je ein Proton errechnet, kann der davon stammende Strukturanteil in beiden Substanzen nur einmal vorkommen. Die beiden Multiplette $\delta = 5,35$ und $\delta = 3,15$ gaben für die Substanzen MA und MB verschiedene Integrationswerte.

Aus der Integration des Multipletts $\delta = 3,15$ errechneten sich zwei Protonen für MA und vier Protonen für MB, aus der des Multipletts $\delta = 5,35$ ein Proton für MA und zwei Protonen für MB. Da diese Protonen in MB im Gegensatz zu MA doppelt auftreten, muß in MB der entsprechende Strukturanteil doppelt vorkommen.

Die Signale dieser Multiplette lassen sich wie folgt zuordnen:

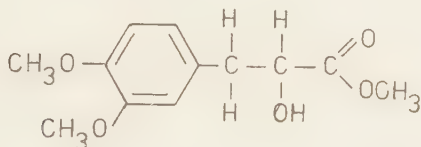
Das Auftreten des Multipletts bei $\delta = 3,15$ (zwei bzw. vier Protonen), ist typisch für eine bzw. zwei CH_2 -Gruppen in Nachbarschaft zum Benzolring mit einem zusätzlichen β -Sauerstoffeffekt. Die Lage des für ein bzw. zwei Protonen integrierenden Multipletts bei $\delta = 5,35$ rechtfertigt eine bzw. zwei CH -Gruppen neben einem Sauerstoffatom und einer benachbarten Carbonylgruppe. Damit würden sich für Substanz MA eine, und für Substanz MB zwei Struktureinheiten eines α -Hydroxihydrozimtsäure-Methylesters ergeben.



Aufgrund der NMR-Informationen mußte das Molekulargewicht von MB wesentlich größer als das von MA sein. Wir nahmen deshalb ein weiteres M-Spektrum von MB auf und erhielten in der Tat ein neues Molekülsignal bei m/e 844. MB zerfällt ohne Zwischenfragmentbildung, ähnlich MA, unter Eliminierung von jeweils m/e 222 über m/e 622 nach m/e 400. Die weitere

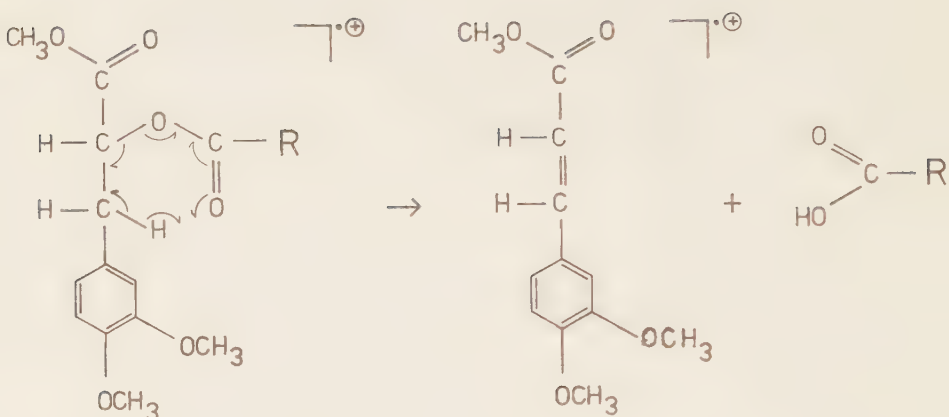
Fragmentierung verläuft wie bei Substanz MA, jedoch erscheint neben den bekannten intensiven Signalen m/e 151, m/e 181, m/e 222, und m/e 337 ein äußerst starkes Signal bei m/e 240, das im Spektrum der Substanz MA nicht vorkommt (Siehe Fragmentierungsschema S.69/71).

Für m/e 240 wäre somit der Methylester der 3-,4-Dimethoxy-β-phenylmilchsäure zu diskutieren.



Dieser Strukturvorschlag stimmt mit den aus der NMR-Spektroskopie gewonnenen Informationen überein. Die zweimalige Abspaltung von m/e 222 spricht ebenfalls für das doppelte Auftreten dieses Strukturanteils in Substanz MB.

Da aus geradzahligen Molekülionen jeweils geradzahlige Fragmentionen unter Abspaltung geradzahliger Bruchstücke entstehen, und unsere Substanz aus den Elementen C, H und O zusammengesetzt ist, können die Bruchstückionen m/e 222 nur durch H-Wanderung aus m/e 223 oder m/e 221 entstehen. Da andererseits die 3-,4-Dimethoxy-β-phenylmilchsäuremethyl-esterkomponente nur ester- oder ätherartig gebunden sein kann, läßt sich nach Mac LAFFERTY ⁵¹⁾ folgende Umlagerung formulieren:



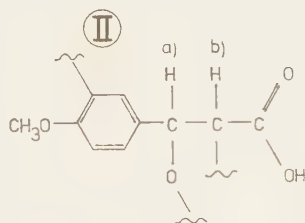
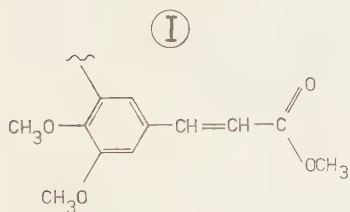
Das Ion m/e 222 entsteht durch Wanderung des in α -Stellung zum Benzolring stehenden Wasserstoffs an die Carbonylgruppe des Restes R unter anschließendem Bruch der C-O Bindung.

Nach KIENITZ ⁴⁶⁾ kann bei dieser Art der Mac Lafferty-Umlagerung die Ladung sowohl am Olefinteil als auch am Säureteil lokalisiert sein, sodaß im M-Spektrum von MA neben m/e 222 ein intensives Ion der Masse 414 registriert wird und im Spektrum von MB intensive Signale bei m/e 622 und m/e 400 auftreten.

Nach den bereits feststehenden Struktureinheiten waren noch die restlichen Signale und Peaks der Spektren von MA und MB zuzuordnen.

Fünf aromatische Protonen, zwei gleichwertige Methoxigruppen und eine separate Methoxigruppe mußten zu zwei Benzolringen gehören. Diese waren mit einer ungesättigten C_3 -Seitenkette, einem Methylester und zwei CH-Gruppen ($\delta = 6,1$ und $4,5$) zu kombinieren. Aus dem Massenspektrum geht hervor, daß der Teil des Moleküls, der nach Mac Lafferty-Umlagerung als Ion der Masse 414 auftritt, eine Carboxylgruppe enthalten muß.

Hieraus leiteten wir folgende zwei vorläufige Strukturen I und II ab,



in denen die richtige Verteilung der aromatischen Protonen und der Methoxigruppen noch gesichert werden muß. Die Massenzahlen der beiden Strukturen ergeben zusammen den erforderlichen Wert 414. In Strukturvorschlag II ist das Proton a) mit seinem δ -Wert 6,1 besonders stark entschirmt und verlangt neben dem Benzolring und einem Sauerstoffatom in Nachbarschaft noch eine weitere elektronenziehende Gruppe. Die Lage des Protons b) ($\delta = 4,5$) verlangt neben der Carboxylgruppe und zwei β -Sauerstoffeffekten ebenfalls die An-

wesenheit eines weiteren elektronenziehenden Nachbarn. Da dem NMR-Spektrum zufolge den beiden Phenylringen nach Abzug der vorhandenen Methoxigruppen je ein Proton fehlte und in der C_3 -Seitenkette der C_6-C_3 -Einheit II noch zwei freie substituierbare Stellen vorhanden waren, für deren Besetzung keine anderen Gruppen mehr zur Verfügung standen, blieb nur noch eine -C-C- bzw. -C-O-C-Verknüpfung der beiden Strukturen übrig.

Nachdem sich Substanz MA ausschließlich aus $C_6 - C_3$ Körpern zusammensetzt, war eine Dimerverbindung mit einer Verknüpfungsweise wie sie z.B. im Dehydrodiconiferylalkohol vorliegt, denkbar. Der Dehydrodiconiferylalkohol stellt eine Zusammenlagerung zweier Moleküle Coniferylalkohol unter Ausbildung eines Cumaransystems dar. (Abb. Nr.10 S.39)

5) Strukturvorschläge

Für das Fragment der Masse 414 erschien uns der nachstehende Strukturvorschlag ① vernünftig. (Abb. Nr.10)

Für die Substanz MA mit dem MG 636 ließe sich unter Berücksichtigung der beobachteten Aufspaltung der Methylsignale im NMR-Spektrum sowie der Mac Lafferty-Spaltung die erweiterte Struktur (2) postulieren. (Bruttoformel: $C_{34}H_{36}O_{12}$) (Abb. Nr.11)

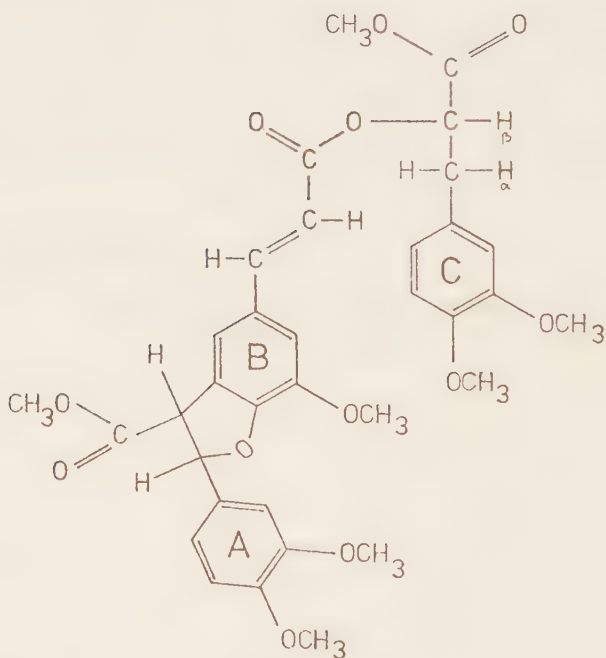


Abb. Nr. 11

Für die Substanz MB mit dem MG = 844 stünde dann die Struktur (3) zur Diskussion. (Bruttoformel: $C_{45}H_{48}O_{16}$) (Abb. Nr. 12)

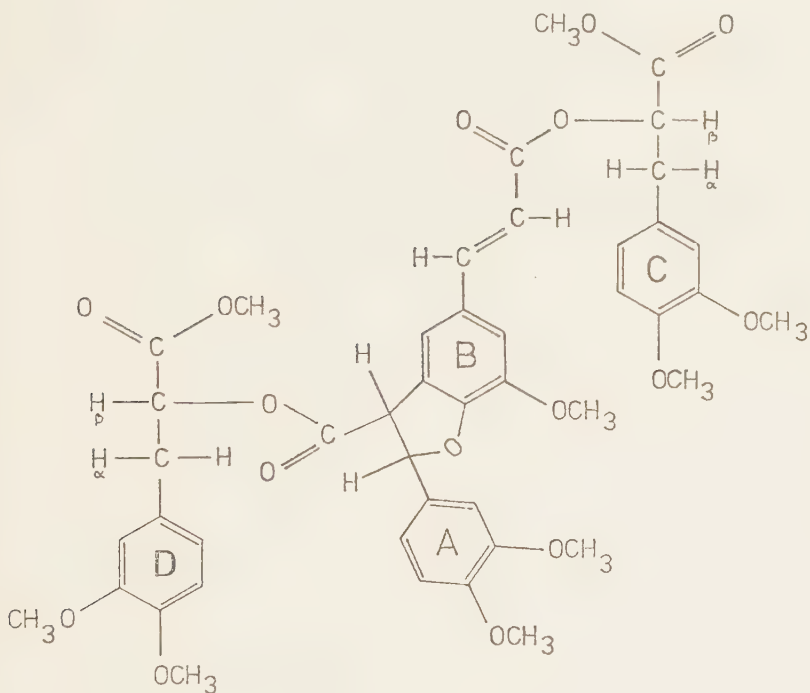


Abb. Nr. 12

Die Bildung der Masse m/e 400 aus m/e 844 durch zweimalige Mac Lafferty-Spaltung fände damit eine plausible Erklärung. Auch das für beide Verbindungen aus den NMR-Spektren abgeleitete 4:1:2- bzw. 6:1:2-Verhältnis der Methoxy- und der

Methylestergruppen würde mit diesem Vorschlag in Einklang stehen.

Schließlich gab auch die früher bereits beobachtete Rotfärbung von LS mit konz. Schwefelsäure einen Hinweis, daß die beiden Struktureinheiten I und II nach Art der Ligninverbindungen oder ähnlicher Dimerverbindungen verknüpft sein müssen.

Diese Reaktion tritt unter Ausbildung konjugierter chinoider Systeme durch Einwirkung konz. Säuren auf. ⁷³⁾

E. Spektroskopische und andere Beweisführungen für die Strukturvorschläge von Substanz MA und MB

1) Zur NMR-Spektroskopie der β -Phenylmilchsäure

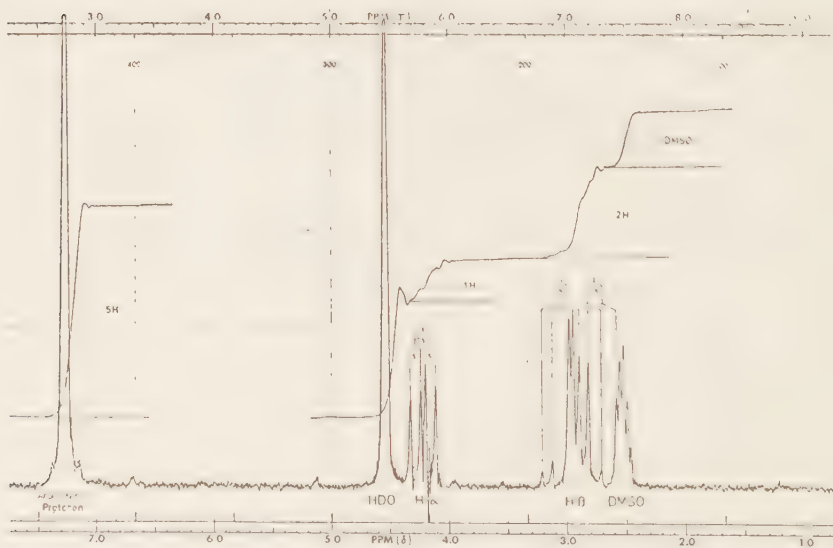


Abb. Nr. 13

NMR-Spektrum der β -Phenylmilchsäure

Im Spektrum der β -Phenylmilchsäure bilden die fünf gleichwertigen Phenylprotonen ein einziges Signal bei $\delta = 7,25$. Die beiden Protonen der β -Methylengruppe sind dem Asymmetriezentrum benachbart und liefern ein AB-Spektrum mit vier Signalen, die mit dem Proton des Asymmetriezentrums koppeln. Daraus resultiert ein klassisches ABX-System mit insgesamt zwölf Linien. Das mit Zentrum bei $\delta = 3,0$ liegende Multiplett der Methylengruppe spaltet in acht Signale auf. Die Kopplungskonstanten betragen $J_{AB} = 13,5$ Hz, $J_{AX} = 7,5$ Hz und $J_{BX} = 5$ Hz. Die Integration ergibt zwei Protonen. Das Multiplett des Methinprotons spaltet in die restlichen vier Linien von ungefähr gleicher Intensität mit den Kopplungskonstanten $J_{AX} = 7,5$ Hz und $J_{BX} = 5$ Hz. Das Quartett erscheint mit Zentrum bei $\delta = 4,2$ und integriert für ein Proton.

Bei einem Vergleich mit den NMR-Spektren von MA und MB findet man dort die Multiplette der Methylengruppen übereinstimmend bei $\delta = 3,15$, doch spalten diese nicht mehr deutlich in acht definierte Linien auf. Die Methinprotonen bilden je ein Quartett, das jedoch um ca. 1,2 ppm nach niederem Feld ($\delta = 5,4$) verschoben ist. Da MA und MB nur veresterte tertiäre OH-Gruppen besitzen, und die Carboxylgruppe ebenfalls verestert ist, nahmen wir auch das Spektrum des Methylesters der β -Phenylmilchsäure auf. Durch die Estergruppe wird das Multiplett des Methinprotons schwach nach tieferem Feld verschoben. Acetyliert man die tertiäre OH-Gruppe, so wird das Methinproton stärker entschirmt und nach noch tieferem Feld verschoben. Das Quartett erscheint jetzt bei $\delta = 5,3$ und damit in gleicher Lage wie das entsprechende Multiplett von MA und MB (Abb. Nr. 8/9).

2) Zur Massenspektroskopie der β -Phenylmilchsäure

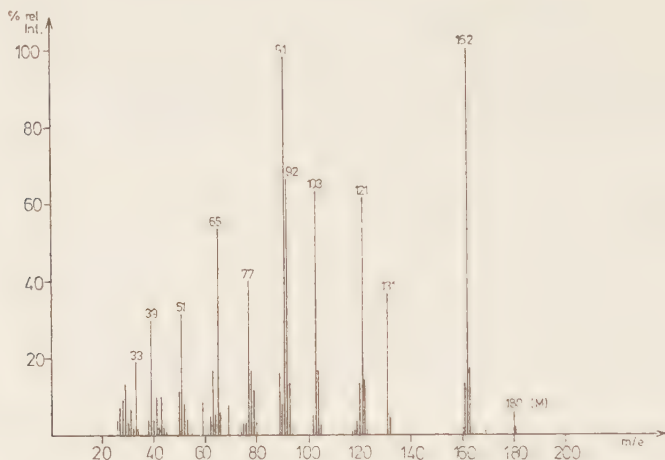


Abb. Nr. 14

M-Spektrum des β -Phenylmilchsäuremethylesters

Im Spektrum des β -Phenylmilchsäure-ME erscheint neben einem schwachen Massenpeak bei m/e 180 als zweitintensivstes Signal das Ion m/e 162 (H_2O -Abspaltung), das dem Signal m/e 222 in den Verbindungen MA und MB entspricht. Das Signal des Ions m/e 131 ($162 - OCH_3$) entspricht dem Ion m/e 191 (MA/MB); das Ion m/e 121 ($M - COOCH_3$) dem Ion m/e 181. (MA/MB) Das Ion m/e 103 ($162 - COOCH_3$) findet man in MA und MB als analoges Ion der Masse 163. Die Bildung des Tropyliumions ist energetisch am meisten begünstigt und wird durch Abspaltung der entsprechenden Fragmente der Seitenkette gebildet. Erwartungsgemäß zeichnet es sich durch das intensivste Signal im Spektrum aus. Der weitere Zerfall des Tropyliumions führt durch Acetylenabspaltung über m/e 65

($C_5H_5^+$) nach m/e 39 ($C_3H_3^+$). Das Ion m/e 77 wird offenbar aus dem Ion m/e 121 durch H_2O -Abspaltung und anschließende Acetylenabspaltung gebildet und zerfällt unter $CH=CH$ -Abspaltung nach m/e 51. Weiterhin finden sich die Signale der abgespaltenen Ionen m/e 59 ($COOCH_3^+$) und m/e 31 (OCH_3^+).

Im M-Spektrum des α -Acetyl- β -phenyl-methylpropionats erhielten wir keinen M-Peak sondern nur ein Signal bei $M - 1$. Das intensivste Signal im Spektrum mit m/e 162 wird durch Mac Lafferty-H-Wanderung unter Abspaltung des Acetatrestes gebildet. Diese Fragmentierung entspricht der Abspaltung von m/e 222 aus Substanz MA (636) und der zweimaligen Abspaltung von m/e 222 aus Substanz MB (844). Die Methoxylabspaltung bewirkt das Signal m/e 191. Die Abspaltung der Carboxymethylgruppe liefert das Ion m/e 161. Die weiteren Fragmentierungen verlaufen wie beim Phenylmilchsäure-ME.

Mit diesen Untersuchungen ist die Abspaltung von m/e 222 aus den Verbindungen und deren Fragmentierung, sowie die Lage und Aufspaltung des Multipletts im NMR-Spektrum dieser Teilstruktur hinreichend erklärt.

3) Na-Methylat-Hydrolyse der Substanzen MA und MB

Da bei einer üblichen sauren oder alkalischen Hydrolyse-methode, abgesehen von anderen möglichen Nebenreaktionen, sämtliche Ester gespalten werden und Substanzen mit freien alkoholischen und freien Carboxylgruppen zu erwarten sind, die im M-Spektrum nicht sehr flüchtig sind und nach anderen Gesetzmäßigkeiten fragmentieren als die Methylprodukte, arbeiteten wir nach der Methode von ZEMPLÉN u. PASCU ⁵²⁾ mit Natriummethylatlösung in der Kälte. Man erhält hierbei außer der freien alkoholischen Gruppe des zu verseifenden Esters ausschließlich Methylestergruppierungen, wobei schon

vorhandene Methylester nicht verändert werden.

Bei der Umsetzung der Substanzen MA und MB nach dieser Methode war neben dem 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäure-ME (m/e 240) mit einer freien tertiären OH-Gruppe ein zweiter Methylester mit der Massenzahl 428 (Abb. Nr. 22, S. 60) zu erwarten.

Nach Hydrolyse und Neutralisation erhielten wir aus den beiden Verbindungen je ein gelbliches Substanzgemisch, das sich bei der Kieselgelchromatographie im Laufmittel Benzol-Aceton (9:1) in je fünf Substanzen auftrennte (siehe Chromatogrammbild Abb. Nr. 15, S. 47).

Im langwelligen UV gab Fleck A schwach rötlich-violette, Fleck B intensiv rötlich-violette Färbung, Fleck C schwach bläuliche, Fleck D stark blaue und Fleck E gelbliche Fluoreszenz.

Im kurzwelligen UV erhielten wir nur für die Flecken B und D eine deutliche Fluoreszenzminderung.

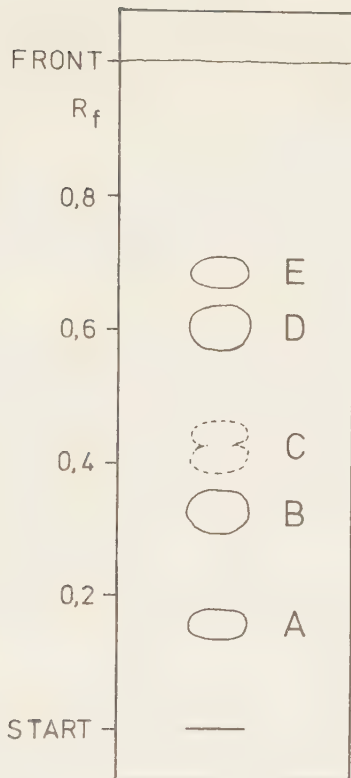


Abb. Nr. 15

DC-Chromatogramm der Hydrolyseprodukte

Adsorbens: Kieselgel

Laufmittel: Benzol-Aceton 9:1

Zur MS-Untersuchung trennten wir die Hydrolyseprodukte auf selbstgestrichenen, gewaschenen Kieselgel HR-Platten Merck und eluierten mit Chloroform.

Zuerst untersuchten wir die beiden intensivsten Zonen B und D. Zone D lieferte ein Spektrum mit dem gesuchten Molekülpeak m/e 428 (Substanz 428) und den Hauptfragmentationen m/e 396, m/e 368 und m/e 337 (siehe Spektrum Abb. Nr. 26 und Fragmentierung S. 65).

Das M-Spektrum der Zone B enthielt intensive Signale der Massen m/e 444, m/e 428, m/e 337 sowie die gesuchten Signale m/e 240 und m/e 222. Das zusätzliche Auftreten der Signale m/e 337 bis m/e 444 im Spektrum der Zone B deutete auf ein Substanzgemisch hin.

Auf der Suche nach der zweiten Komponente, dem erwarteten 3-,4-Dimetnoxi-B-phenylmilchsäuremethylester mit dem MG 240 (Substanz 240) untersuchten wir auch die Flecken A, C und E. Keine davon gab jedoch den erwarteten Molekülpeak. Die Substanzen dieser Flecken zerfielen im M-Spektrum nach ähnlichen Regeln wie Substanz 428 und gaben teilweise dieselben Signale.

Sie stellen offenbar die bei der alkalischen Umesterung entstandenen Nebenprodukte dar. Eine genaue Identifizierung dieser Substanzen erschien nicht lohnend.

Daß MA und MB bei der Hydrolyse die gleichen Grundkörper bilden, ergab sich aus den gleichen, in der DC nachgewiesenen Hydrolyseprodukten und aus der Tatsache, daß diese jeweils gleiche M-Spektren lieferten.

Da die Zone B bei verschiedenen Temperaturen der Ionenquelle auch verschiedene Intensitäten der Fragmentierungsgruppen ergab, mußte, wie bereits vermutet, ein Gemisch vorliegen.

Beim Besprühen des DC-Chromatogramms mit konzentrierter Schwefelsäure und Erhitzen auf 110° lieferte Zone B zunächst eine kräftige Rotfärbung. Nach einiger Zeit wurden ca. 2/3 dieser Zone von einem zweiten, diesmal schwarzen Fleck überdeckt.

Ein Parallelversuch mit Phenylmilchsäure-ME ergab nach Besprühen mit H_2SO_4 konz. und längerem Erhitzen ebenfalls Schwarzfärbung. Daraus schlossen wir, daß neben der sich schwarz färbenden Substanz 240 eine weitere Substanz mit ligninartigem Charakter vorhanden war.

Der Versuch einige mg der Zone B durch präparative DC-Chromatographie zu isolieren, führte zu einem Produkt, das offensichtlich ein Gemisch von 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäure-ME und einer Substanz X mit Masse 444 darstellte.

4) Versuche zur Darstellung eines 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-esters aus Substanz 240

Da Versuche zur chromatographischen Trennung der beiden in der Zone B liegenden Substanzen fehlschlagen, versuchten wir die Substanz 240 durch Umsetzung mit einem geeigneten Reagens aus dem Gesamthydrolysegemisch abzutrennen. Dies war praktisch nur durch Derivatbildung an der freien ter-tiären Hydroxylgruppe zu erreichen.

Neben der Möglichkeit der Acetylierung (FREUDENBERG u. NIMZ ⁵³), der Umesterung mit 3-Nitro-phthalsäureanhydrid (LENNARTZ ⁵⁴) oder 3-,5-Dinitrobenzoesäurechlorid (SHRINER u. FUSON ⁵⁵) zu den entsprechenden Estern, erschien uns die von BUTENANDT, BECKMAN u. HECKER ⁵⁶) erstmals bei der Identifizierung der Alkoholfraktion des Sexuallockstoffes Bombykol verwendete Methode durch Umsetzung mit 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid (HECKER ⁵⁷) am besten geeignet.

Der Vorteil dieser Methode besteht neben der quantitativen Umsetzung in der großen Farbintensität des entsprechenden Esters und im hohen Schmelzpunkt des Reaktionsproduktes.

Wir ließen zunächst einige mg unseres Hydrolysegemisches mit der Lösung von 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid in Benzol reagieren. Im DC des Reaktionsgemisches waren neben den, nach der Na-methylatverseifung beobachteten Flecken A, B, C, D, E eine Reihe weiterer Flecke mit z.T. orangeroter Eigenfarbe sichtbar.

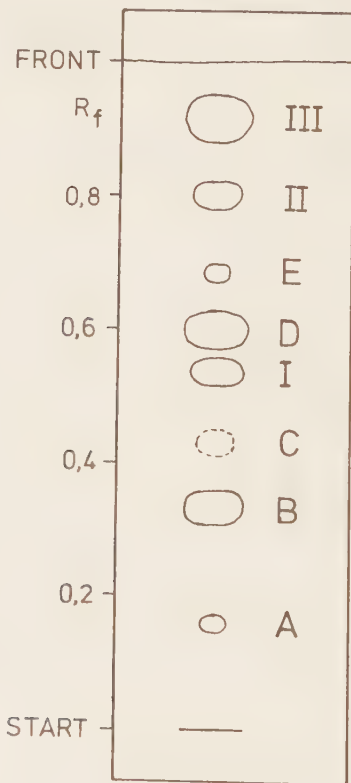


Abb. Nr. 16

DC-Chromatogramm der Hydrolyseprodukte
nach Umsetzung mit 4'-Nitroazobenzol-carbon-
säure-(4)-chlorid.

Adsorbens: Kieselgel

Laufmittel: Benzol-Aceton 9:1.

Neben zwei neu aufgetretenen, orangeroten Flecken (Fleck II und III) erschien bei Rf 0,45 ein dritter Fleck (Fleck I) der unter UV-Licht 360 nm kräftig dunkelblau fluoreszierte und unter 254 nm starke Fluoreszenzminderung gab. Nach Besprühen mit H_2SO_4 konz. und längerem Erhitzen färbte sich dieser Fleck I über rot nach dunkelbraun. Der frühere Doppelfleck B (Rf 0,3) war unter UV-Licht kaum mehr sichtbar und trat, mit H_2SO_4 konz. besprüht und erhitzt, nur noch als scharf abgegrenzte Zone auf.

Die MS ergab für die Zone B im oberen Massenbereich keine Signale mehr, sondern nur noch das Molekülion m/e 240 von 3-,4-Dimethoxy-3-phenylmilchsäureME und dessen Fragmentsignale (siehe Fragmentierungsschema S.52/53).

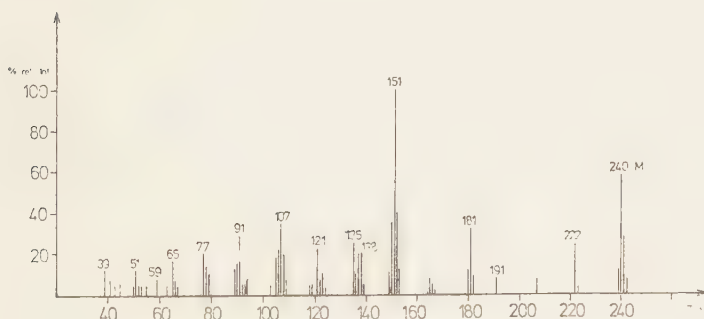


Abb. Nr. 17
M-Spektrum der Substanz 240

Die Fragmentierung des Moleküliions erfolgt in zwei Serien:

Serie A



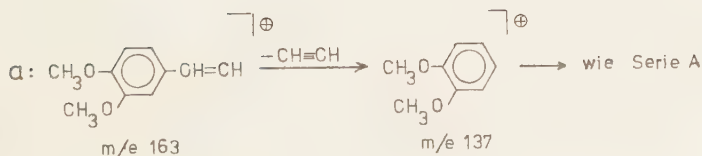
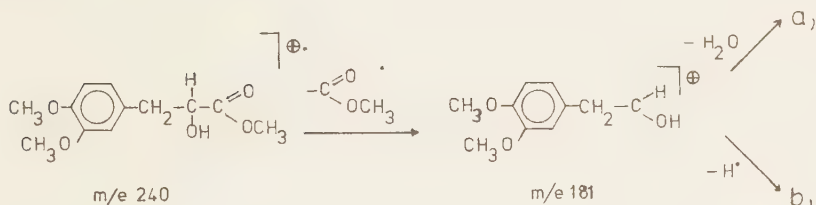
Serie A: Das Moleküliion zerfällt durch die energetisch stark begünstigte H_2O -Abspaltung in das Ion der Masse m/e 222 des DimetnoxizimtsäureME. Dieses kann durch Abspaltung

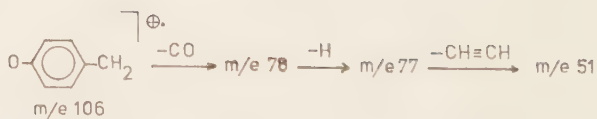
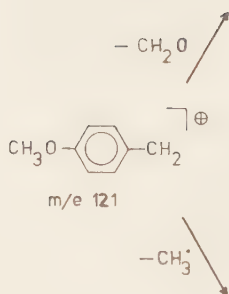
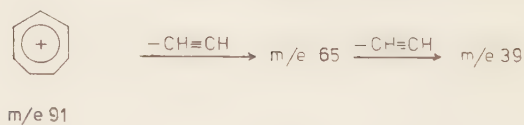
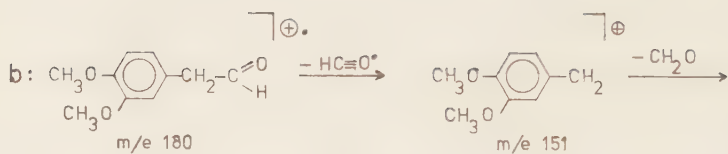
des Methoxi-Radikals nach m/e 191 und weiter unter CO-Abspaltung in das Dimethoxystyryliumion m/e 163 zerfallen, das seinerseits durch Acetylenabspaltung in das Dimethoxyphenylkation zerfallen kann.

Die Abspaltung der Methoxigruppen erfolgt auf zweierlei Wegen:

1. durch Eliminierung eines CH_3 -Radikals und folgende CO-Abspaltung zum Oxepin-Ion, das durch Wasserabspaltung in das Phenylion m/e 77 übergeht. (BARNES u. OCCOLOWITZ ⁵⁸)
2. durch Abspaltung von jeweils einem Mol Formaldehyd durch Vier-Ring-H-Umlagerung zum Phenylkation m/e 77 ⁵⁹ ⁶⁰).

Serie B





Serie B: Das Molekülion eliminiert das COOCH_3 -Radikal, wobei das Ion m/e 181 entsteht. Dieses kann durch Abspaltung von H_2O in das Ion m/e 163 zerfallen und, wie oben beschrieben, weiter fragmentieren. Eine weitere Möglichkeit des Zerfalls ergibt sich durch Abspaltung eines Wasserstoffs und Eliminierung eines $\text{HC} = \text{O}$ -Radikals zum Ion m/e 151. Die Bildung des Dimethoxitropyliumions ist energetisch äußerst begünstigt. Deshalb tritt dieses Ion als intensivstes im Spektrum auf und entsteht u.a. durch Abspaltung der entsprechenden Seitenkette. Das Dimethoxitropyliumion kann in erster Linie unter zweifacher Formaldehydabspaltung in das Tropyliumion m/e 91 zerfallen, das seinerseits wieder unter zweifacher Acetylenabspaltung über m/e 65 nach m/e 39 weiter fragmentiert. In Nebenreaktionen kann nach Verlust des CH_3 -Radikals ein Molekül CO eliminiert werden und es entsteht unter Aufnahme eines Protons das Phenylkation, das unter Acetylenabspaltung weiter zerfällt.

Das M-Spektrum des neu aufgetretenen Fleckens I gab weder das Spektrum mit dem erwarteten Molekülpeak 444, noch das Spektrum eines Reaktionsproduktes mit dem 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid-Reagens. Statt dessen lieferte es ein Spektrum mit dem Molekülpeak m/e 470, in dem die Signale m/e 444, m/e 428 und m/e 337 und weitere Fragmentationen auftraten. Anscheinend wurde die nach Hydrolyse im Fleck B neben dem 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME zusätzlich auftretende Substanz X mit der Masse 444 durch die Veresterungsreaktion verändert. Da die Struktur der Masse 444 noch unbekannt war, waren auch über die neu aufgetretene Substanz m/e 470 keine konkreten Angaben möglich.

Bei der massenspektrometrischen Überprüfung der neu aufgetretenen orangeroten Flecken II und III konnten wir den Fleck II als NABS-Derivat des 3-,4-Dimethoxy- β -phenyl-

milchsäureME identifizieren. Die Klärung des Fleckens III gelang nicht.

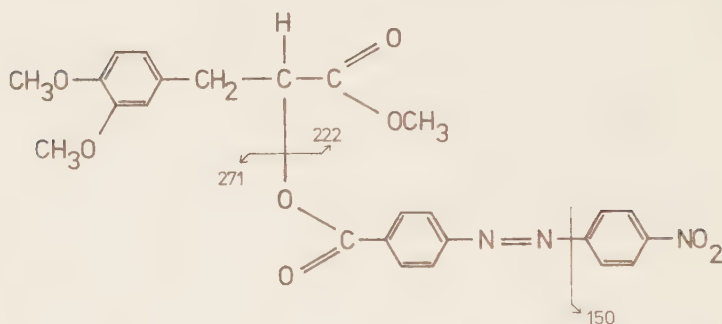


Abb. Nr. 18

Struktur des 3-,4-Dimethoxyphenyl-2-O-(4' Nitro-azobenzoyl) propionsäuremethylesters

Im M-Spektrum dieser Substanz traten folgende wichtige Massenzahlen auf:

M: 493; m/e 463; m/e 271; m/e 254; m/e 241; m/e 222; m/e 207; m/e 191; m/e 151; m/e 137; m/e 121.

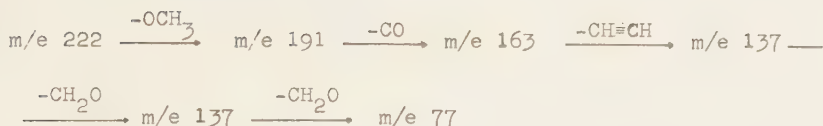
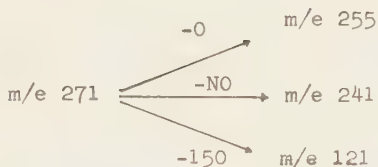
m/e 151, m/e 222 und m/e 271 stellen die intensivsten Signale des Spektrums dar.

Fragmentierungen des Moleküllions m/e 493:

m/e 463 entsteht durch Abspaltung von NO; m/e 151 wahrscheinlich durch Bruch an der CH₂-Gruppe und Eliminierung der entsprechenden Seitenkette.

Durch Mac Lafferty-Umlagerung entstehen die Ionen m/e 271

und m/e 222. Diese können nach folgendem Schema fragmentieren:



Damit war gezeigt, daß die α -Hydroxigruppe zwar mit dem Reagen eine Esterbindung eingegangen war, diese Reaktion aber nicht quantitativ verlaufen war.

5) DC-Trennung des Hydrolysegemisches von MA und MB und Untersuchungen der Substanzen 240 und 428

a) DC-Trennung

Später fanden wir in dem Lösungsmittelgemisch Dichlormethan-Chloroform-Äthylacetat-Propanol (45:45:4,5:4,5) STAHL u. JORK ⁶¹⁾ ein Fließmittel, das am Adsorbens Kieselgel die Substanz X vom 3-,4-Dimetnoxi- β -phenylmilchsäureME und den anderen Produkten des Hydrolysegemisches zufriedenstellend trennte.

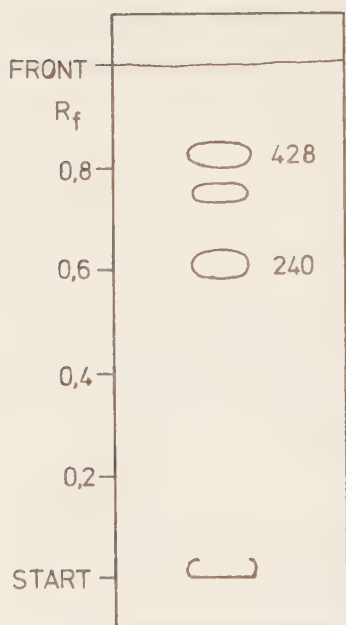


Abb. Nr. 19

DC-Chromatogramm des
Hydrolysegemisches von
MA und MB

Adsorbens: Kieselgel

Laufmittel: Dichlor-
methan-Chloroform-Äthyl-
acetat-Propanol
(45:45:4,5:4,5)

Wir trennten die Substanz 240 und die Ligninkomponente der Masse 428, die nach den bisherigen Informationen den 4'-Methoxy-dehydrodiferulasäureME darstellte, durch präparative DC ab. Wir erhielten den 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME als hellen, glasklaren und die Substanz 428 als leicht gelblichen, harzigen Sirup.

Beide Substanzen wurden UV-, IR-, NMR- und massenspektrometrisch untersucht.

b) Zur Struktur der Substanz 240

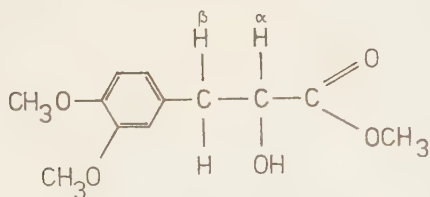


Abb. Nr. 21

NMR-Spektrum der Substanz 240 (Ausschnitt)

Das NMR-Spektrum liefert ein Singulett bei $\delta = 6,1$ für drei Phenylprotonen, ein Multiplett bei $\delta = 4,45$ für das Proton (α) der tertiären OH-Gruppe, ein Singulett bei $\delta = 3,87$ für zwei Methoxigruppen, ein Singulett bei $\delta = 3,78$ für eine OCH_3 -Estergruppe, ein Multiplett bei ca. $\delta = 3,0$ mit einer Aufspaltung in acht Signale für die am Kern stehende Methylengruppe. (H-8). Diese Werte sind in Übereinstimmung mit denen der β -Phenylmilchsäure (Siehe Abb. Nr. 13 S. 42).

Die Abbildung des M-Spektrums mit entsprechender Diskussion der Fragmentionen erfolgte bereits unter Abb. Nr. 17 S.51-54.

c) Zur Struktur der Substanz 428

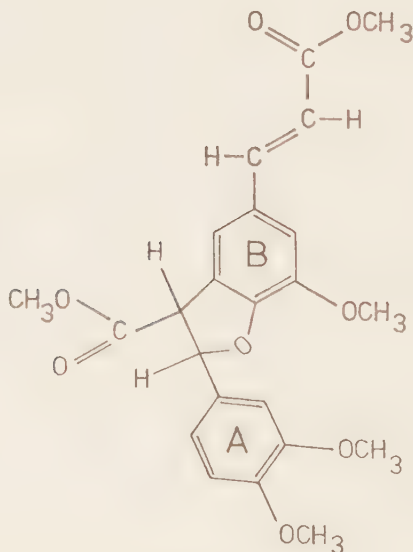


Abb. 22

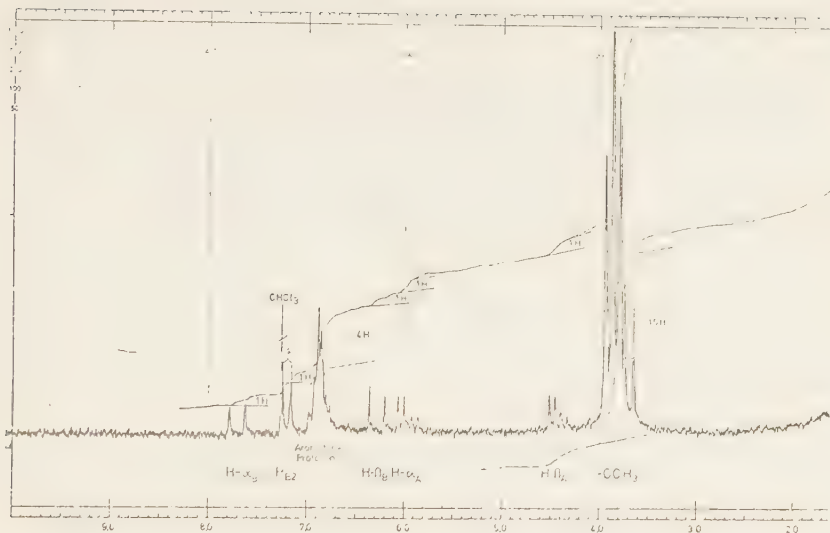


Abb. Nr. 23
NMR-Spektrum der Substanz 428 (Ausschnitt)

Das 100 MHz-Spektrum der Substanz 428 ist durch folgende Signale charakterisiert:
die beiden Dublette bei $\delta = 6,28$ und $\delta = 7,70$ ($J = 16$ Hz) für die α_B - und β_B -ständigen Vinylprotonen. Das Dublett bei $\delta = 6,03$ mit einer Kopplungskonstanten von 6 Hz stammt von dem α_A -Proton des Cumaranringes. Das Dublett bei $\delta = 4,48$ ($J = 6$ Hz) entspricht dem β_A -Proton des Cumaranringes, die Signale der Methylprotonen im Bereich von $\delta = 3,7$ bis $\delta = 4,0$ den drei Methoxigruppen und den beiden Methylestergruppierungen.

Im Bereich der aromatischen Protonen zwischen $\delta = 6,5$ und $\delta = 7,5$ erscheint neben einem Multiplett bei $\delta = 6,7$ ein Dublett bei $\delta = 7,2$ mit einer Kopplungskonstanten von 9 Hz. Da das eine Signal dieses Dubletts mit dem Lösungsmittelpeak zusammenfällt, ist die Integration in diesem Bereich nicht exakt auszuwerten. Trotzdem spricht eine 9 Hz-Kopplung eindeutig für eine o-Kopplung zweier Phenylprotonen. Somit wäre die oben für Substanz 428 postulierte Formel (Abb. Nr. 22) entsprechend zu korrigieren.

Zur Klärung nahmen wir die Spektren in einem anderen Lösungsmittel auf und führten ein Entkopplungsexperiment im fraglichen Bereich durch.

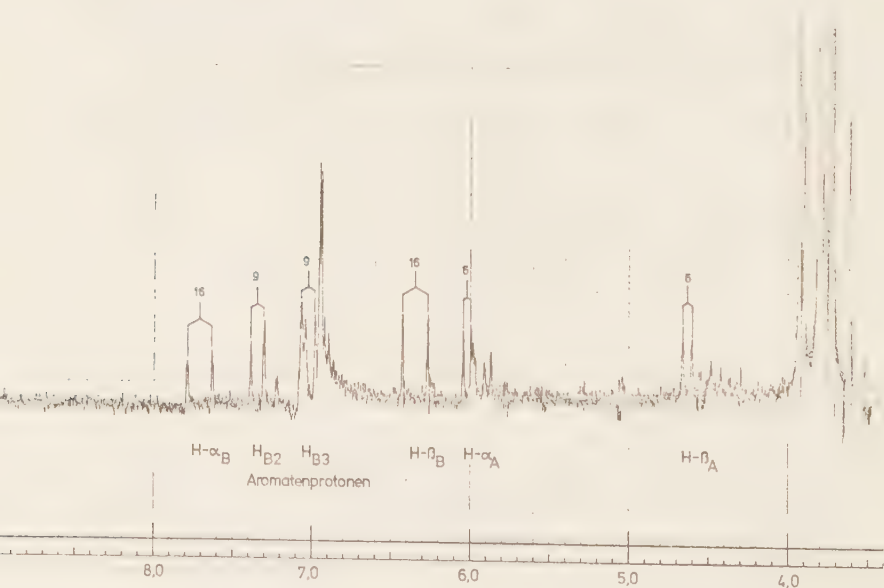


Abb. Nr. 24

Ausschnitt aus NMR-Spektrum der Substanz 428
(Lösungsmittel: Aceton)

Durch die Änderung des Lösungsmittels erhielten wir im aromatischen Bereich eine schärfere Trennung der Signale. Neben dem Dublett des Protons H_{B2} bei $\delta = 7,35$ mit $J = 9$ Hz ist jetzt auch das Dublett des zweiten Protons H_{B3} bei $\delta = 7,02$ ($J = 9$ Hz) genau zu erkennen. Das Entkopplungsexperiment bestätigte die Zugehörigkeit der beiden Signalgruppen. Damit steht die o-Kopplung im Ring B fest, und die Struktur müßte ohne Berücksichtigung der Stereochemie folgendermaßen abgeändert werden: (vergleiche dazu Abb. Nr. 22 S. 60)

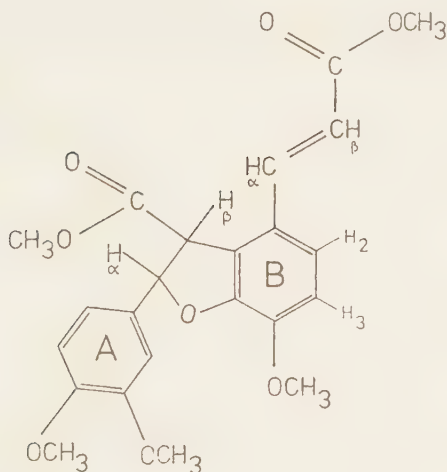


Abb. Nr. 25

Im Massenspektrometer zerfällt Substanz 428 nach folgendem Schema:

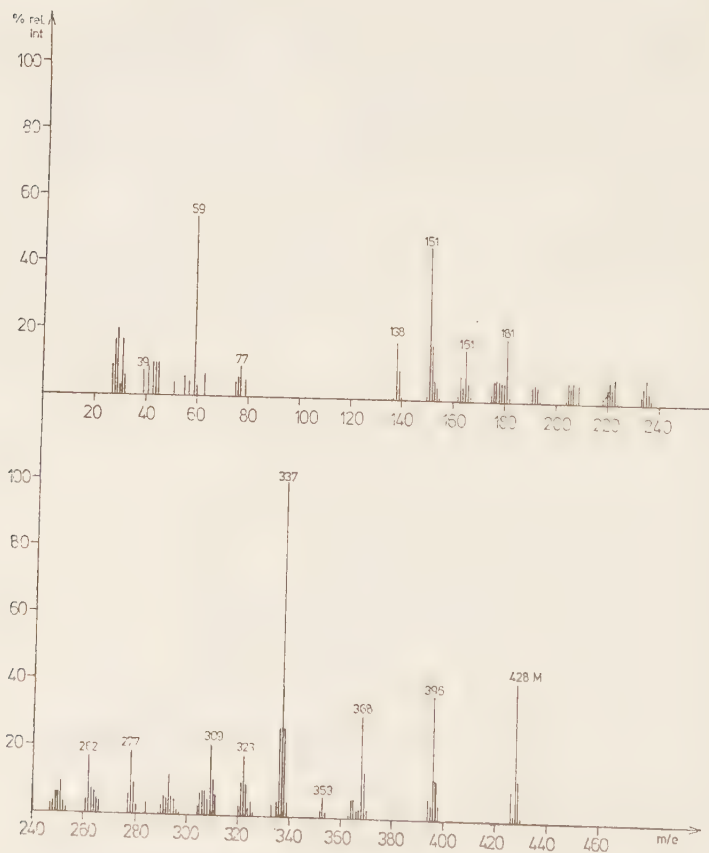
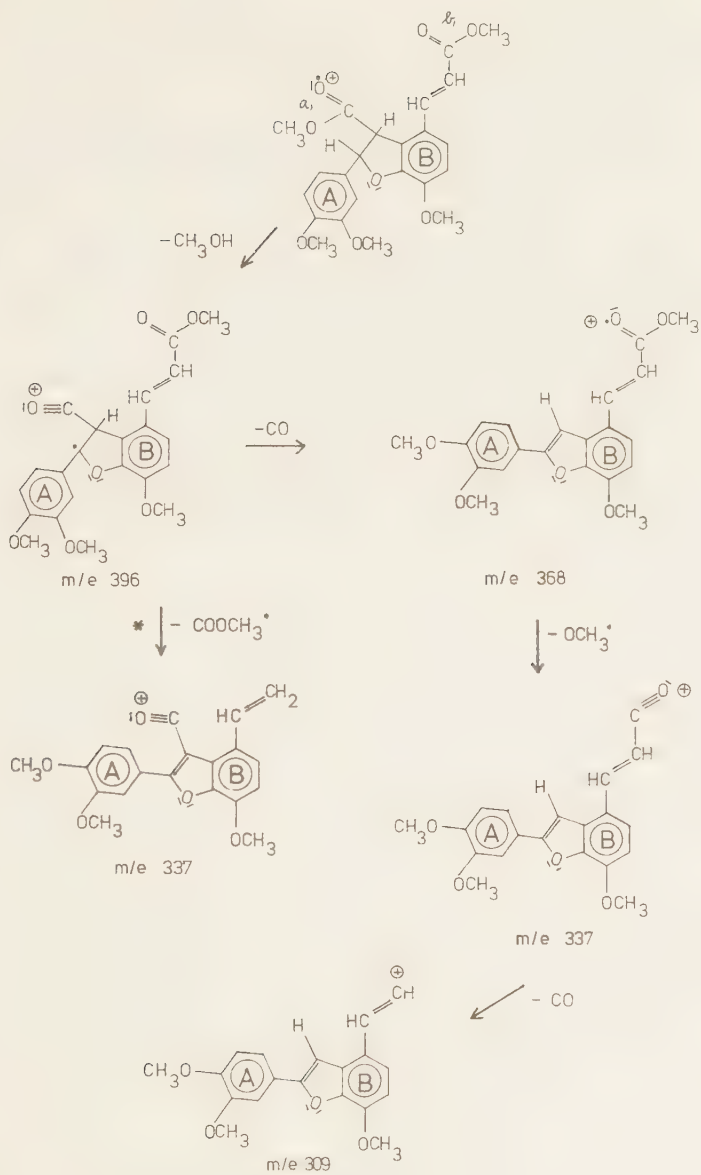
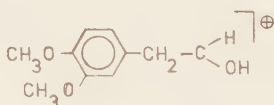


Abb. Nr. 26
M-Spektrum der Substanz 428

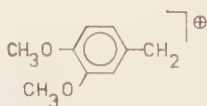


Das Molekülion m/e 428 eliminiert zuerst Methanol aus der Estergruppierung a) und der in Nachbarschaft stehenden α_A -Wasserstoff des Cumaranringes, wodurch das Ion m/e 396 entsteht. Die Eliminierung des α_A -Wasserstoffs wird durch das benachbarte Sauerstoffatom des Cumaranringes stark begünstigt. Durch weitere Abspaltung von CO (bei a)) entsteht das Ion m/e 368 unter Ausbildung eines Cumaronringes mit einer positiven Ladung am Sauerstoff bzw. an der Carbonylgruppe der zweiten Esterkomponente b). Durch Eliminierung des Methoxiradikals der Estergruppe b) entsteht das intensivste Signal im Spektrum, das Ion m/e 337, das durch CO-Abspaltung nach m/e 309 zerfallen kann. Parallel kann aus dem Ion 396 durch Abspaltung des COOCH_3 -Radikals der Estergruppe a) das Schlüsselbruchstück m/e 337 gebildet werden. Dieser Zerfall ist durch einen metastabilen Peak bei m/e 286 gesichert. Durch weiteren Zerfall treten im Spektrum folgende Bruchstückionen auf:

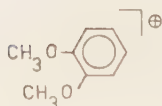
m/e 181



m/e 151



m/e 137



m/e 77



und das durch Abspaltung der COOCH_3 -Gruppe gebildete Ion m/e 59.

6) Darstellung und spektroskopische Untersuchungen des Dehydrodiferulasäuredimethylesters

In unserem ersten Vorschlag für Substanz 428 (Abb. Nr. 22, S. 60) hatten wir den 4-Methoxy-dehydrodiferulasäuredimethylester vorliegen. Für spektroskopische Vergleichszwecke versuchten wir den Dehydrodiferulasäuredimethylester zu synthetisieren.

"Dehydrodiferulasäure" stellten CARTWRIGHT u. HAWORTH ⁶²⁾ aus Ferulasäure durch Oxidation mit FeCl_3 in wäßrig-alkoholischer Lösung dar. Sie erhielten einen Lignankörper, ein Dilacton, in dem die beiden β -C-Atome miteinander verknüpft sind.

FREUDENBERG u. RICHTZENHAIN ⁶³⁾ dehydrierten Ferulasäure mittels Pilzpolymerase, konnten jedoch das Dimerprodukt nicht von höherpolymeren Produkten abtrennen. 1954 dimerisierten FREUDENBERG u. SCHUHMACHER ⁶⁴⁾ Ferulasäureester durch Erhitzen der Substanzschmelze mit Spuren wäßriger Perchlorsäure zu einem Dimerprodukt mit Hydrindenstruktur. Weiterhin machten sie die Beobachtung, daß sich Coniferylalkohol auf diesem Wege nicht dimerisieren ließ. Ein dem Dehydrodiconiferylalkohol analoges Produkt synthetisierten NIMZ, NAYA u. FREUDENBERG ⁶⁵⁾ durch enzymatische Dehydrierung des Ferulasäureäthylesters mit Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 . Bei diesem Verfahren treten durch radikalische Reaktion neben dem Dimerprodukt noch höher und hochpolymere Verbindungen auf. Die Ausbeute an Dimerprodukt gaben die Autoren mit ca. 21 % an.

Wir stellten den Ferulasäuremethylester mit Diazomethan dar, trennten vom gebildeten 3-,4-Dimethoxiprodukt ab und versetzten die stark verdünnte, wäßrig-alkoholische Lösung des Esters mit H_2O_2 und Peroxidase. Nach 24 Stunden unterbrachen wir die Reaktion und trennten das Dimerprodukt säulenchromatographisch von den braungefärbten Polymerprodukten ab.

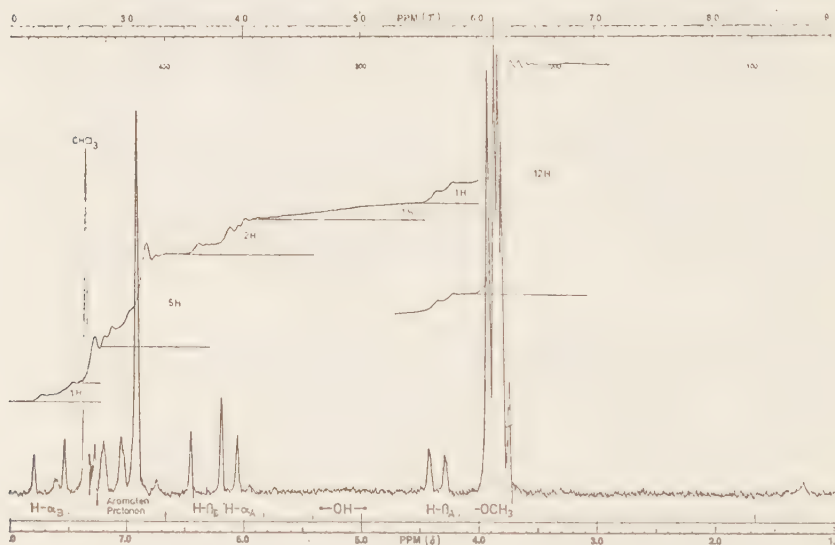


Abb. 27

NMR-Spektrum des Dehydrodiferulasäuredimethylesters

Das NMR-Spektrum des synthetisierten Dehydrodiferulasäuredimethylesters gab in Chloroform ebenso wie Substanz 428 bei $\delta = 4,4$ und $\delta = 6,13$ ($J = 8$ Hz) die Signale für die α_A - und β_A -Protonen des Cumarinringes und die Signale der

α _B- und β _B-Vinylprotonen bei $\delta = 6,45$ und $\delta = 7,7$ ($J = 16$ Hz) sowie die Methylpeaks bei $\delta = 3,85$. Im aromatischen Bereich trat jedoch keine, für o-ständige Phenylprotonen typische 9 Hz-Kopplung auf. Damit dürfte die von dem Dehydrodiferulasäuremethylester abweichende Struktur unserer Verbindung 428 bewiesen sein.

F) Endgültiger Strukturvorschlag für die Substanz MB

Wie sich massenspektrometrisch zeigen läßt, müssen in Substanz MB (MG = 844) die beiden Carboxylgruppen des Cumaran-systems jeweils mit einem Mol 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME verestert sein.

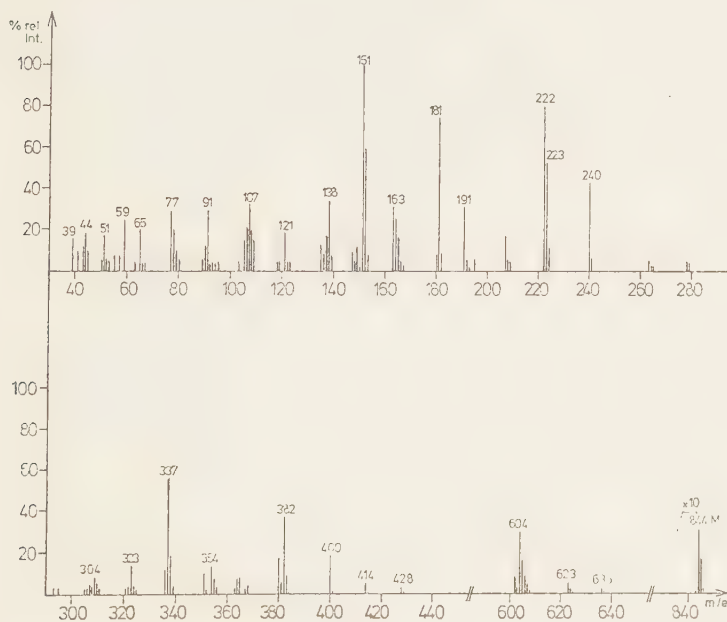


Abb. Nr. 28
Massenspektrum der Substanz 844

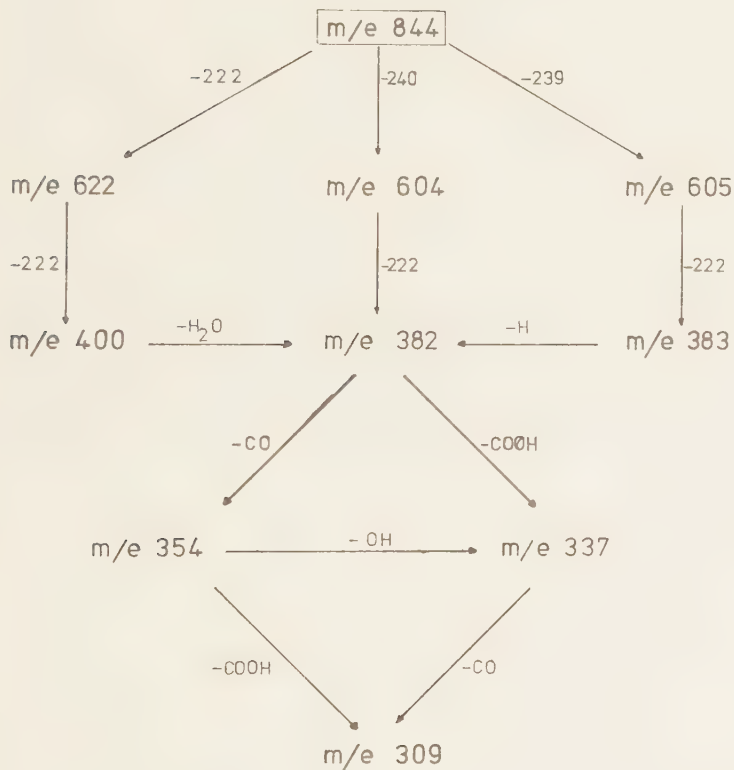
Die Fragmentierung des Moleküliions M^{+} 844 zum Cumaran-
grundkörper m/e 337 erfolgt dabei auf drei Wegen:

- a) durch doppelte Mac Lafferty-Abspaltung von m/e 222 nach
 m/e 400,
- b) durch Abspaltung von m/e 240 nach m/e 604, das nach Mac
Lafferty-Spaltung in m/e 382 übergeht und
- c) durch Abspaltung von m/e 239 unter Bildung von m/e 605.

Die Spaltung b) ist nur an der Carboxylgruppe des Cumaran-
ringes möglich. Voraussetzung für diese Spaltung ist die
Wanderung des α_A -Wasserstoffs des Cumaransystems an den
 α -Sauerstoff der β -Phenylmilchsäure nach Bruch der Ester-
bindung. Die Ablösung des α_A -Wasserstoffs wird durch das
Sauerstoffatom des Cumaranrings begünstigt. Eine Wanderung
des α_B -Wasserstoffs der Zimtsäuregruppierung ist nach
EMERY ⁶⁶⁾ aus energetischen Gründen ausgeschlossen. Da bei
dieser Art der Umlagerung die Ladung in beiden Fragmenten
erscheinen kann, ^{46/50)} muß neben dem Ion m/e 604 ein Ion
 m/e 240 entstehen. Dieses Signal erscheint in unserem Spek-
trum mit entsprechender Intensität.

Das Fragmention m/e 400, entstanden durch doppelte m/e 222-
Abspaltung, kann am Cumaranring nach dem gleichen Mechanis-
mus der m/e 240-Fragmentierung H_2O abspalten, wobei das
Ion m/e 382 entsteht. Dieses fragmentiert durch Eliminie-
rung der Carboxylgruppe an der Zimtsäuregruppierung weiter
in das Ion m/e 357. Eine CO-Eliminierung aus m/e 382 ergibt
 m/e 354, welches unter $OH^{\cdot}$ -Verlust nach m/e 337 bzw. $COOH^{\cdot}$ -
Verlust nach m/e 309 übergeht.

Fragmentierungsschema der Substanz MB



Formelvorschlag für Substanz MB:

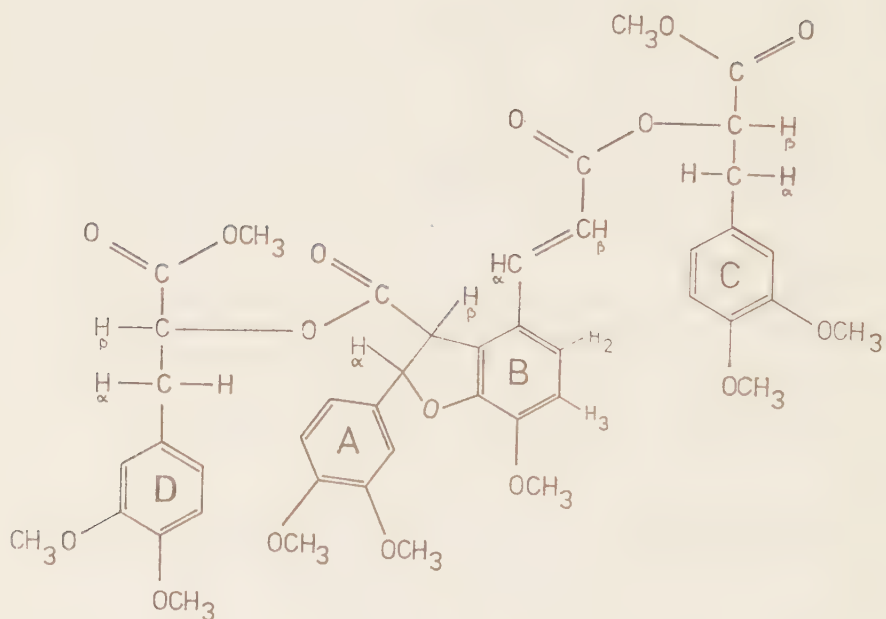


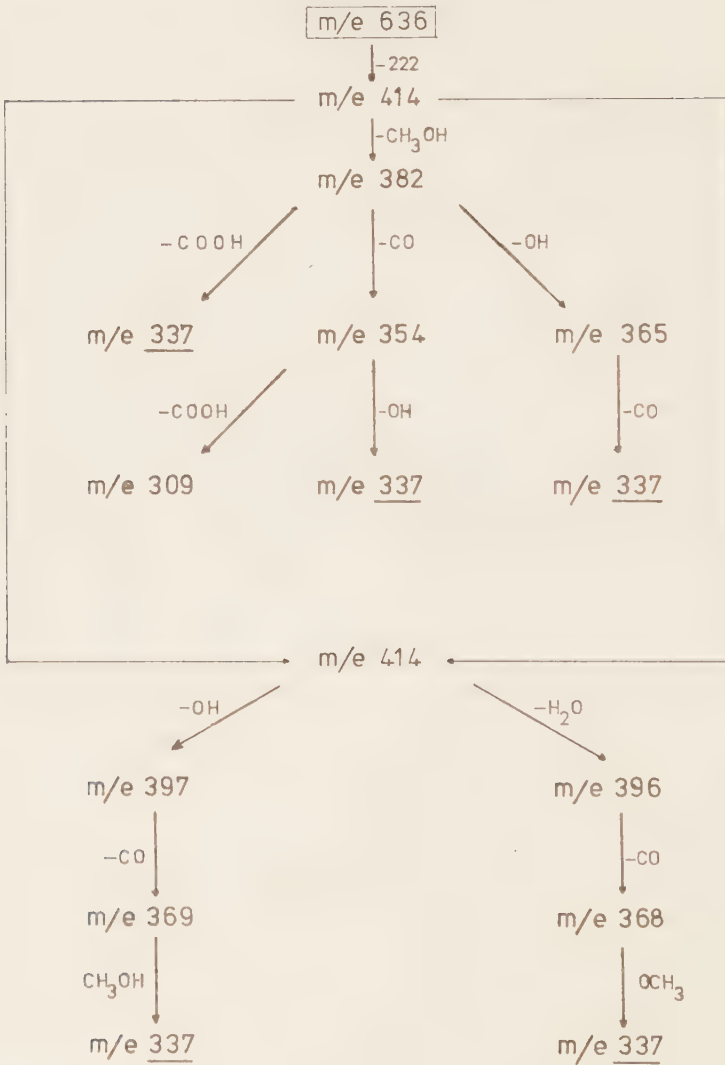
Abb. Nr. 29

In Abb. Nr. 9, S. 31 ist das NMR-Spektrum der Verbindung MB mit der Zuordnung der Protonen angegeben.

G) Endgültiger Strukturvorschlag für die Substanz MA

Um zu entscheiden, mit welcher Carboxylgruppe der Substanz MA der 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME verestert ist, gelten die gleichen Überlegungen, die zu den Fragmentationen m/e 604 bzw. m/e 240 der Substanz MB führten. Im Spektrum der Substanz MA (Abb. Nr. 7, S.26) finden wir kein Signal der Masse m/e 240, sondern nur ein intensives Signal der Masse m/e 222. Daraus ergibt sich, daß der 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME nur durch Mac Lafferty-Umlagerung abgespalten wird. Andererseits finden wir intensive Signale für eine Methanol-Eliminierung. Diese kann nur an der Methylestergruppe des Cumaranrings durch gleichzeitige Eliminierung des α_A -Cumaranringwasserstoffs erfolgen. Da wir kein Signal m/e 240 finden konnten, und die Abspaltung des OCH_3 -Radikals, das aus der Estergruppe des 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME eliminiert werden kann, gegenüber der Methanolabspaltung verschwindend gering ist, kann die 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME-Gruppe nur mit der Carboxylgruppe des Zimtsäureteils verestert sein.

Fragmentierungsschema der Substanz MA



Formelvorschlag für Substanz MA

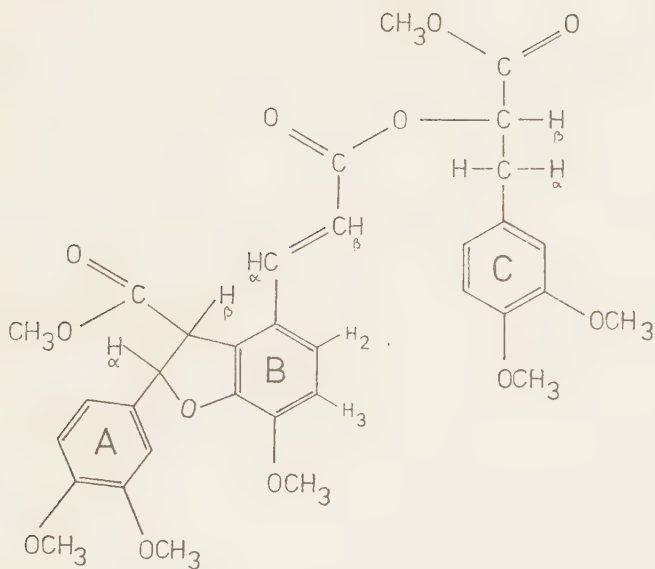


Abb. 30

In Abb. Nr. 8, S. 30 ist das NMR-Spektrum der Verbindung MA mit der Zuordnung der Protonen angegeben.

H) Zur Stereochemie der Substanzen MA und MB

Mit der Stereochemie der Ligninkörper, besonders der des Dehydrodiconiferylalkohols, und der des Dehydrodiisoeugenols, beschäftigten sich vor allem LUDWIG, NIST u. Mc CARTHY ⁶⁷⁾ und AULIN-ERDMAN u. TOMITA ⁶⁸⁾. Während LUDWIG et al. für die beiden Cumaranringprotonen des Dehydrodiconiferylalkoholtriacetats cis-Konfiguration diskutierten, berichteten AULIN-ERDMAN u. TOMITA ⁶⁸⁾ von einer trans-Konfiguration der entsprechenden Protonen des Dehydrodiisoeugenols.

In unseren Substanzen dürfte aus Gründen der Ringspannung das Phenylcumaransystem in einer Ebene liegen. Die beiden α_B - und β_B -Vinylprotonen der Zimtsäurekomponente sind auf Grund der Kopplungskonstanten von 16 Hz ⁶⁹⁾ trans-ständig angeordnet. Über die Konfiguration der beiden α_A - und β_A -Protonen des Cumaranrings kann die NMR-Spektroskopie näheren Aufschluß geben. Nach LUSTIG ⁷⁰⁾ beträgt die Kopplungskonstante für die cis-Konfiguration des Indanonsystems 9,15 Hz, für die trans-Konfiguration 3,65 Hz. Unsere Kopplungskonstante mit $J = 6$ Hz spricht mehr für eine trans-Konfiguration. AULIN-ERDMAN ⁶⁸⁾ gibt eine Kopplungskonstante von 5,2 Hz für das Dehydrodiisoeugenol an. Durch oxidativen Abbau und Vergleichsmessung konnte er die trans-Konfiguration beweisen. Da sich unsere Werte mehr den Angaben von AULIN-ERDMAN ⁶⁸⁾ nähern, schlagen wir eine trans-Stellung der H-Atome im Cumaranring vor. Ein massenspektrometrisches Experiment könnte möglicherweise noch näheren Aufschluß geben, wenn man die H_2O -Abspaltung aus der entsprechenden Säure oder die Methanolabspaltung aus den entsprechenden Methylestern der cis- und trans-Verbindungen miteinander vergleicht. CD-Messungen ^{71) 72)} der Substanzen 428 und MA brachten we-

gen des großen Störpegels bei der Messung keine weiteren Ergebnisse.

Zusammenfassung und Diskussion

Nachdem die von JOHNSON ¹²⁾ für die Lithospermsäure vorgeschlagene Formel (siehe S. 4) von SCHMIECHEN u. GIBIAN ¹⁴⁾ in Frage gestellt worden war, und eine Strukturverwandtschaft mit Chlorogensäurederivaten nicht bestätigt werden konnte, ergaben eingehende Untersuchungen mit Hilfe der NMR- und Massenspektroskopie an Methylderivaten und verwandten Testsubstanzen, daß der Lithospermsäure eine ligninähnliche Struktur zukommen muß. Diese mußte aus C_6-C_3 -Einheiten aufgebaut sein, wobei zwei ein Cumaransystem bilden, das mit ein oder zwei Phenylmilchsäurekomponenten verestert ist. Wir erhielten aus unserem Ausgangsgemisch zwei Substanzen, deren spektroskopisches Verhalten fast völlig mit den bekannten Strukturen des Dehydrodiconiferylalkohols bzw. der Dehydrodiferulasäure übereinstimmten. Abweichend von diesen Verbindungen muß in der Lithospermsäure eine cumaranartige Verknüpfungsweise zweier Phenylpropaneinheiten über den Benzolring zur C_3 -Kette durch Bildung eines 5-Ringes vom C_5 - und C_6 -Atom des Phenylringes zum α - und β -C-Atom der C_3 -Kette vorliegen. Nachdem in unserer Ausgangsverbindung keine OCH_3 -Gruppen nachgewiesen werden konnten, schlagen wir für die Lithospermsäure A und B die nachfolgenden Strukturen vor:

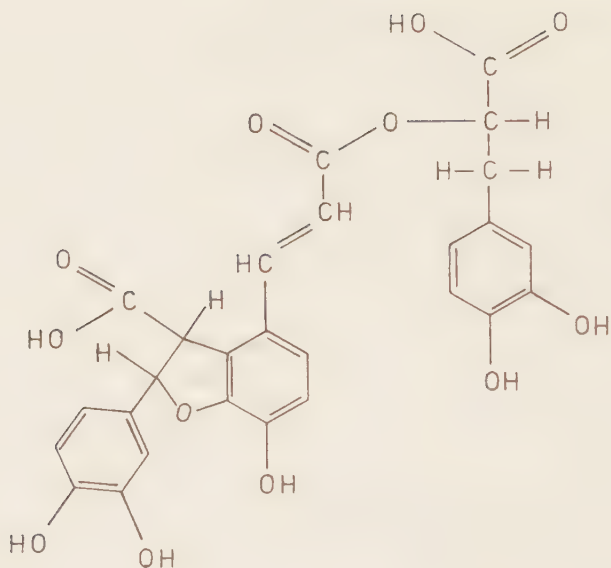


Abb. Nr. 31

Lithospermsäure A

7 Hydroxi-4- [2-carb(1-carboxy -1-(3,4 hydroxibenzyl))
methoxiviny] -2- [3,4 hydroxiphenyl]-3-carboxy -
2,3 dihydro - benzofuran

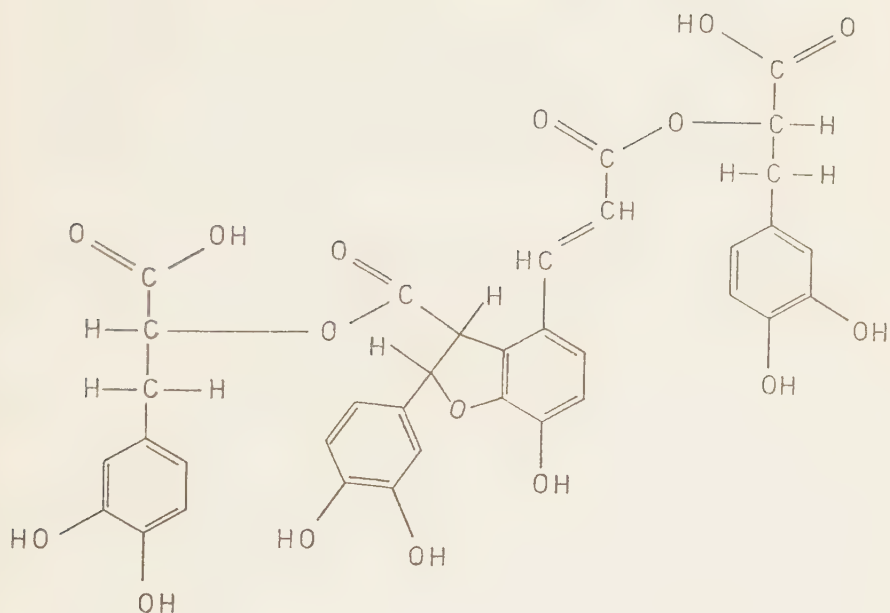


Abb. Nr. 32

Lithospermsäure B

7 Hydroxi-4- [2-carb(1-carboxy -1-(3,4 hydroxibenzyl))
methoxiviny] -2- [3,4 hydroxiphenyl] -3-carb(1-carboxy
-1-(3,4 hydroxibenzyl)) methoxi- 2,3 dihydro-benzofuran

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Herkunft der Drogen

- I. Das Kraut von *Lithospermum officinale* L. wurde in den Monaten Juni und Juli in den Isarauen bei München gesammelt. Das Pflanzenmaterial wurde unter guter Belüftung bei ca. 35° getrocknet; die Blätter wurden abgestreift und in der Drogenmühle pulverisiert.
- II. Die Wurzeln von *Lithospermum officinale* wurden bei der Firma Dr. Madaus u. Co. im Juli/August von einer Kultur gesammelt, bei ca. 45° unter vermindertem Luftdruck getrocknet und anschließend pulverisiert.

B. Allgemeine Arbeitsmethoden

I. Papierchromatographie

Die orientierenden Untersuchungen der Phenolcarbonsäuren wurden papierchromatographisch durchgeführt: Papier 2043 b Mgl der Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel, Entwicklung absteigend in Glaskammern 60 x 50 x 20 über eine Strecke von 45 cm.

Laufmittel:

5 %ige Essigsäure

n-Butanol-Eisessig-Wasser (40:10:19)

Chloroform-Methanol-Eisessig (80:30:5)

II. Dünnschichtchromatographie

1. Sorptions- und Laufmittel

a) Kieselgel

13,0 g Kieselgel HF₂₅₄ der Fa. Merck wurden mit 40 ml H₂O angerührt und auf fünf Glasplatten 12 x 20 cm ausgestrichen. Die Platten wurden eine halbe Stunde bei 120° aktiviert.

15 g Kieselgel HR (reinst) der Fa. Merck wurden in 30 ml H₂O eingerührt und ca. 15 Minuten zum Quellen stehen gelassen. Danach rührten wir fünf Minuten gut durch und strichen auf fünf Platten 12 x 20 cm aus.

Kieselgelfertigplatten Merck₆₀

Kieselgelfertigfolien Polygram SIL G/UV₂₅₄ der Fa. Machery, Nagel u. Co., Düren.

Kieselgelfertigplatten SiO₂ ohne Indikator der Fa. Woelm, Eschwege.

Laufmittel

Phenolcarbonsäuren:

Toluol-Propanol-Eisessig-Wasser (15:18:10:5)

Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (7:2:1)

Chloroform-Eisessig-Wasser (50:45:10)

Chloroform-Äthylformiat-Ameisensäure (20:75:5)

Methylprodukte:

Benzol-Äthanol (8:2)

Benzol-Äthylacetat (6:5)

Benzol-Aceton (9:1)

Chloroform-Dichlormethan-Äthylacetat-Propanol (45:45:4,5:4,5)

b) Cellulose

7 g Cellulosepulver MN 300 G der Fa. Machery, Nagel u. Co.,
Düren, wurden mit 35 ml Wasser am Magnetrührer suspendiert
und gleichmäßig auf fünf Glasplatten 12 x 20 ausgestrichen.
Die Platten wurden 15 Minuten bei 100° getrocknet.

Laufmittel

n-Butanol-Eisessig-Wasser (40:10:19)

Chloroform-Methanol-Eisessig (80:30:5)

Äthanol-Wasser (8:2)

c) Polyamid

7,2 g MN-Polyamid DC der Fa. Machery, Nagel u. Co., Düren,
wurden mit 36 ml Methanol am Magnetrührer homogenisiert und
auf fünf Glasplatten 12 x 20 ausgestrichen. Die Platten
wurden kurz bei 100° getrocknet.

Laufmittel

Phenolcarbonsäuren:

Methanol p.a.-Wasser (8:2)

Methanol p.a.

Butanol-Eisessig-Wasser (4:5:1)

Butanol-Isopropanol-Ameisensäure (5:4:1)

Methylprodukte:

Methanol p.a.-Wasser (75:25)

d) Imprägnierte Schichten

15 g Kieselgel wurden mit 50 ml 2,5 %iger KHSO_4 -Lösung angerührt und auf fünf Glasplatten 12 x 20 ausgestrichen.

Laufmittel

Äther-Äthylacetat (6:4) n H_2SO_4 gesättigt.

Butylacetat dest. 2n HCl gesättigt.

2. Sprühreagentien

a) Eisen-III-chloridlösung: 75)

1 %ige Lösung von FeCl_3 in 0,5 n Salzsäure.

b) Basische Bleiacetatlösung: 76) 77)

25 %ige Lösung von bas. Bleiacetat in Wasser.

c) Benedicts-Reagens: 78)

173 g Natriumcitrat und 117 g Natriumcarbonat werden in 700 ml Wasser heiß gelöst. Nach dem Filtrieren fügt man langsam eine Lösung von 17,3 g Kupfer-II-sulfat in 100 ml Wasser hinzu und füllt nach dem Abkühlen mit Wasser auf 1000 ml auf.

d) Naturstoff-Reagens: 79)

Diphenylborsäure- β -aminoäthylester wird zu 1 % in Methanol gelöst und das Chromatogramm nach Besprühen im UV-Licht betrachtet.

e) Echtblausalz-B-Reagens: 80)

Sprühlösung I: frisch bereitete Echtblausalz-B-Lösung
0,5 % in Wasser.

Sprühlösung II: 0,1 n Natronlauge

Das Chromatogramm wird nacheinander mit I und II besprüht.

f) Diazotierte Sulfanilsäure-Lösung: 81)

25 g Sulfanilsäure werden in 125 ml 10 %iger Kalilauge gelöst. Nach dem Abkühlen wird mit 100 ml 10 %iger Natriumnitritlösung versetzt. Diese Lösung wird allmählich in eiskalte Salzsäure gegeben. Das gebildete Diazoniumsalz wird abgenutscht, mit Eiswasser, Äthanol und Äther gewaschen und luftgetrocknet. Als Sprühlösung wird 0,1 g Salz in 20 ml 10 %iger wäßriger Sodalösung gelöst.

g) Natriumnitrit-Reagens: 23)

2 g Natriumnitrit werden in möglichst wenig Wasser gelöst, die Lösung mit 100 ml Methanol verdünnt und 2,5 g Essigsäure zugesetzt. Das Chromatogramm wird mit 0,5 n meth. Kalilauge nachgesprüht.

h) H₂SO₄ konz.

1) Morin-Reagens (für Chinasäure): 35)

0,25 %ige Lösung von Morin (2',4',5,7 Hydroxiflavanol) in Methanol.

III. Präparative Dünnschichtchromatographie

1. Zur Massenspektroskopie

Eine nach II/1/a hergestellte Kieselgel-HR-Platte, Schichtdicke 0,25 mm, wurde einmal mit einem polaren Fließmittel (meist Methanol) und zweimal mit dem zur Trennung verwendeten Laufmittel gewaschen, indem wir das Lösungsmittel jeweils bis zum oberen Rand laufen ließen. Nach dem Trocknen der Platten wurde das in Chloroform p.a. gelöste, methylierte Substanzgemisch strichförmig aufgetragen (2 - 4 mg/Platte) und die Platte im entsprechenden Laufmittelsystem B/II/1/a entwickelt. Nach Abdunsten des Lösungsmittels markierten wir unter UV-Licht die fluoreszierenden Zonen. Die zu untersuchenden Zonen schabten wir aus, eluierten zweimal mit 3 ml Chloroform p.a. am Whirlimix, zentrifugierten hochtourig ab und engten die Lösung auf einen Tropfen ein, den wir mit einer Mikroliterspritze aufnahmen und in ein Proberöhrchen des Massenspektrometers ausfüllten. Anschließend ließen wir das Lösungsmittel im Probenröhrchen abdunsten.

2. Zur Gewinnung größerer Substanzmengen

a) Phenolcarbonsäuren:

5 mg Substanz LS wurden strichförmig auf mit Aceton gewaschene Kieselgelfertigplatten SiO_2 Woelm aufgetragen und im Laufmittel Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (2:7:1) bei ca.

5° entwickelt. Nach dem Markieren unter UV-Licht wurden die Zonen möglichst schnell ausgekratzt, das Kieselgel dreimal mit 5 ml Aceton am Whirlimix eluiert und die Acetonphasen hochtourig zentrifugiert. Wir engten unter Stickstoffatmosphäre auf ca. 1 ml ein, versetzten mit 1 ml Wasser, entfernten den Rest Aceton und gaben die wäßrige Phase zur Gefriertrocknung.

b) Methylprodukte:

Mehrere Fertigplatten Merck₆₀ wurden mit Methanol und dem zur Trennung verwendeten Fließmittelgemisch wie bei III/2~~h~~ beschrieben gewaschen. Wir trugen die Substanz (ca. 5 - 7 mg) wie zuvor beschrieben auf und entwickelten im entsprechenden Laufmittel. Nach dem Ausschaben der vorher unter UV-Licht markierten Zonen füllten wir das Kieselgel in eine Papphülse und eluierten ca. 3 Stunden mit Chloroform p.a. am Soxhlet.

IV. Säulenchromatographie

1. Kieselgelsäulen

Wir verwendeten Kieselgel Merck (0,05 - 0,2 mm), das mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt wurde. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 6 - 12 Tr./Min. bei 1,5 - 2,5 cm Säulendurchmesser; 12 - 25 Tr./Min. bei Säulen mit einem Durchmesser von 3 - 5 cm.

2. Cellulosesäulen

Die Cellulosesorten wurden mit n HCl unter ständigem Rühren mehrere Stunden eisenfrei gewaschen, drei-mal mit Wasser nachgewaschen und bei 80° getrocknet. Das Cellulosematerial

wurde mit dem Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt und mit der Wasserstrahlpumpe festgezogen.

a) Ederol-Cellulose Nr 221 (quantitativ) der Fa. J.C. Binzer, Hatzfeld/Eder.

Elutionsmittel: 5 %ige Essigsäure; ca. 10 Tr./Min..

b) Cellulose der Fa. Machery, Nagel u. Co., Düren.

Elutionsmittel: Chloroform-Methanol-Eisessig (80:30:5); ca. 15 Tr./Min..

3. Polyamidsäulen

Polyamid ⁷⁴⁾ wurde durch wiederholtes, mehrstündiges Rühren erst mit Wasser und anschließend mit Methanol von löslichen Bestandteilen befreit. Nach dem Absaugen wurde das Polyamid mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt und solange gewaschen, bis sich die Schicht gleichmäßig abgesetzt hatte. Die Tropfgeschwindigkeit betrug entsprechend dem Säulendurchmesser 12 - 25 Tr./Min..

C. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Wir trockneten die Substanzen bei den Schmelzpunkten angepaßten Temperaturen in der Trockenpistole über Diphosphor-pentoxid und bestimmten den Schmelzintervall auf der Koflerheizbank der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Mikroanalysen

Die Bestimmungen wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt.

UV-Spektren

Einzelmessungen wurden mit einem Zeiss-Opton-Spektralphotometer PMQ II durchgeführt. Spektren wurden mit einem automatisch registrierenden Spektrophotometer Beckmann DK-2A in 1 cm Küvetten aufgenommen.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit einem Beckmann-Spektrophotometer IR-8 in KBr aufgenommen.

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren wurden am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit einem Varian A-60 A und am Max-Planck-Institut für Biochemie München mit einem Varian HA-100 Kernresonanzspektrometer aufgenommen.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie München mit einem Varian MAT SM 1-A bei 70 eV und 300 μ A und am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München mit einem A.E.I. MS 30-Gerät aufgenommen. (70 eV, 300 μ A; Temp: 100 - 200°)

Optische Drehungen

Die Drehungen wurden im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss (LEP A2) gemessen.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte aus einer Acetonlösung im Dampfdruckkosmometer Mechrolab Modell 301A.

D. Isolierung von "Substanz LG" und chemische Untersuchungen

I. Isolierung

In einem Rundkolben wurden ca. 400 g Wurzeldroge mit 2 l salzsaurem Wasser ($\sim 0,08$ n HCl), dem 3 % Ameisensäure zugesetzt waren, (bzw. 400 g Blattdroge mit 4 l Extraktionsmittel) unter ständigem CO_2 -Strom auf der Schüttelmaschine zwei Stunden extrahiert. Das Material wurde schnell zentrifugiert, der Rückstand nochmals denselben Extraktionsbedingungen unterworfen und unter CO_2 -Strom filtriert. Dabei war besonders darauf zu achten, daß möglichst keine Braunfärbung des Drogenmaterials auftrat. Sämtliche Filtrate wurden vereinigt und zehnmal mit ca. 150 ml, über Al_2O_3 neutr. gereinigtem und peroxidfreiem Äther ausgeschüttelt. Das Wasser der gelblichen Ätherphase wurde durch Ausfrieren und Trocknen mit Na_2SO_4 entfernt. Die Ätherphase engten wir am Rotationsverdampfer unter Sauerstoffausschluß bis auf wenige ml ein, bliesen den Rest des Lösungsmittels mit N_2 ab und nahmen den Rückstand mit einigen ml 5 %iger Essigsäure auf. Diese essigsäure Lösung gaben wir auf eine gut gepackte Cellulosesäule R/IV 1 (Ederolcellulose, eisenfrei gewaschen) und eluierten mit 5 %iger Essigsäure. Wir verfolgten die Auftrennung unter UV-Licht, verwarfen die vorauslaufenden bläulich fluoreszierenden Zonen und fingen die breite, dunkelbraune Zone auf. Das gelblich gefärbte Eluat schüttelten wir solange mit peroxidfreiem Äther aus, bis die wäßrige Phase farblos war. Die Ätherphase wurde getrocknet und unter Sauerstoffausschluß am Rotationsverdampfer eingengt, mit wenig Methanol-Eisessig (10:1) aufgenommen und auf einer Cellulosesäule R/IV 2 (MN-Cellulose, eisenfrei gewaschen) mit dem Laufmittel Chloroform-Methanol-Eisessig (80:30:3) getrennt. Unter UV-Licht verfolgten wir die ein-

zelnen Zonen. Eine vorauslaufende, blau fluoreszierende Zone wurde verworfen, die folgende dunkelgraue Zone fingen wir in mehreren Fraktionen auf, vereinigten nach chromatographischer Prüfung die reinen Fraktionen, destillierten das Lösungsmittel unter schonenden Bedingungen ab und versuchten durch mehrmaliges Destillieren mit trockenem Aceton die Essigsäure zu entfernen. Den gelben Rückstand lösten wir in wenig Äther und versetzten mit der 100fachen Menge trockenem Chloroform und schüttelten um. Es fiel ein weißgrauer Niederschlag aus, den wir vorsichtig unter N_2 -Strom absaugten und auf dieselbe Weise nochmals reinigten. Wir erhielten aus 400 g Wurzeldroge 880 mg der weißgrauen Substanz LS, die wir über Phosphorpentoxid trockneten.

Bei der Extraktion aus Blattmaterial war die Ausbeute wesentlich geringer. Wir isolierten aus 400 g Drogenmaterial ca. 150 mg reine Substanz. Durch den wesentlich größeren Anteil an Nebenprodukten erhielten wir bei der zweiten säulenchromatographischen Trennung nur relativ wenig einheitliche Substanz und mußten den Rest einer weiteren säulenchromatographischen Trennung unterziehen. Die gewonnenen Substanzen LS aus der Blatt- und Wurzeldroge waren identisch.

"Substanz LS"

Schmp.: $130^{\circ}C$ (Zersetzung)

opt. Drehung: $[\alpha]_D^{23} + 130^{\circ}$ (Methanol) - Konz.: $c = 0,95$

DC: Kieselgel / Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (5:4:1)

R_f 0,05; 0,1; 0,2

Molekulargewicht: 682 (osmometrisch)

UV (Methanol p.a.): $\lambda_{max.}$ (230) 255; 286; 308; (340) nm

IR (in KBr): OH: $3250 - 3400\text{ cm}^{-1}$; CO: 1710, 1695, 1660 cm^{-1} ;

γ C = α (aromat. in Konjugation mit Vinyl und Carbonyl): 1610 cm^{-1} ; $\text{HC} = \text{CH}(\text{trans})$: 975 cm^{-1}

II. Hydrierung der Substanz LS

25 mg Substanz LS wurden in 25 ml Methanol p.a. gelöst und mit einer Spatelspitze Paladiumkohle versetzt. Das Ganze wurde unter H_2 -Atmosphäre (Ballon) ca. 24 Stunden am Magnetührer gerührt. Nach Abfiltrieren und Einengen der Lösung chromatographierten wir auf Kieselgel (B/II/a) mit dem Laufmittel Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (2:7:1).

Die Eigenfluoreszenz war verschwunden. Beim Besprühen mit FeCl_3 -Lösung färbten sich die beiden Flecken mit R_f 0,20, 0,38 wesentlich intensiver als die Flecken von LS, die ihre Farbe von graugrün nach graudunkelviolett änderten.

Schmelzpunkt: 115° C

UV (Methanol p.a.): λ_{max} 286 nm

III. Hydrolysen der Substanz LS

1. Saure Hydrolysen mit H_2SO_4

25 mg Substanz LS bzw. 5 mg Chlorogensäure wurden in 10 ml 0,1 n H_2SO_4 gelöst und drei Stunden bei ca. 100° unter Stickstoffatmosphäre hydrolysiert. Die Hydrolyselösung wurde mit Äthylacetat mehrmals ausgeschüttelt und die Äthylacetatphase säurefrei gewaschen. Wir chromatographierten auf Kieselgelplatten (B/II/a) mit dem Laufmittel Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (2:7:1) und konnten neben unveränderter Substanz LS einen stark gelb fluoreszierenden Fleck nachweisen. Bei der quantitativen Trennung dieser Hydrolyseprodukte auf einer Kieselgelsäule (B/IV/1) 1,5 x 15

cm mit dem Laufmittel Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (2:7,5:0,5) erhielten wir nur 1,5 mg dieser gelb fluoreszierenden Substanz.

Im Chromatogramm der hydrolysierten Chlorogensäure konnten wir neben unveränderter Chlorogensäure einen starken Kaffeesäurefleck nachweisen. Die saure, wäßrige Lösung wurde mit feinst gepulvertem Bariumhydroxid vorsichtig neutralisiert, filtriert und auf ca. 1 ml eingengt. Die chromatographische Überprüfung auf Kieselgelplatten mit dem oben angegebenen Laufmittel ergab nur für die Chlorogensäuretestlösung eine positive Reaktion auf Chinasäure nach Besprühen mit Morinlösung und H_2SO_4 konz..

Hydrolyse mit 5 n H_2SO_4 unter denselben Bedingungen und DC-Überprüfung nach B/II/a ergab eine Reihe von Flecken, die wir nicht identifizieren konnten. Substanz LS war nicht mehr nachzuweisen.

2. Saure Hydrolyse mit HCl

5 mg Substanz LS bzw. 5 mg Chlorogensäure wurden in 10 ml n HCl gelöst und zwei Stunden am Rückfluß bei 100° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde wie oben ausgeschüttelt und DC-chromatographisch untersucht (B/II/a). Neben unveränderter Substanz LS fanden wir einen orangen und einen blau fluoreszierenden Flecken, die wir nicht identifizieren konnten. Parallel hydrolysierte Chlorogensäure wurde unter denselben Bedingungen zum Teil in Kaffeesäure und Chinasäure gespalten.

Bei der Einwirkung von 5 n HCl unter den gleichen Bedingungen und derselben Aufarbeitung erhielten wir bei der Auftrennung an Kieselgel (Laufmittel: Toluol-Äthylformiat-

Ameisensäure 3:7:1) keine Substanz LS mehr, sondern neben einem orangen Fleck mehrere andere Substanzen, deren Identifizierung nicht möglich war.

3. Alkalische Hydrolyse mit 2n KOH

10 ml 2n KOH wurden am Magnetrührer von einem Stickstoffstrom durchperlt und nach leichtem Erwärmen 5 mg Substanz LS zugegeben. Unter Stickstoffatmosphäre wurde vier Stunden gerührt. Die anfänglich stark gelb gefärbte Lösung änderte ihre Farbe innerhalb kurzer Zeit, wurde rötlich und ging allmählich in intensivrote Färbung über. Wir säuerten nach vierstündiger Reaktion die Lösung leicht an, wobei die Farbe nach gelb wechselte, und schüttelten mit Äther, Chloroform und Äthylacetat aus. Die drei organischen Phasen wurden säurefrei gewaschen, getrocknet, eingeeengt und auf DC-Platten B/II/a chromatographiert. Wir konnten durch Vergleich weder Kaffeesäure, Ferulasäure, Protocatechusäure, Veratrumsäure noch Brenzcatechin nachweisen.

IV. Acetylierung der Substanz LS

1. Acetanhydrid-Pyridin

50 mg Substanz LS wurden in 1 ml wasserfreien Pyridin gelöst und mit 1 ml Acetanhydrid versetzt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 12 Stunden geschüttelt und anschließend auf dem siedenden Wasserbad 1 1/2 Stunde erhitzt. Nach dem Erkalten gossen wir das Reaktionsgemisch unter Rühren auf 10 ml Eiswasser, rührten ca. eine Stunde weiter und nutschten das ausgefallene Acetat ab. Die DC-Prüfung nach B/II/a auf Kieselgel (Laufmittel Benzol-Pyridin-Ameisensäure (72:18:10)) ergab ein Gemisch aus zehn Substanzen. (42 mg)

2. Acetanhydrid Na-acetat

50 mg Substanz LS wurden mit 1 ml Acetanhydrid und 100 mg gegläutem Na-acetat versetzt, eine Stunde leicht erwärmt und weitere 30 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen gaben wir das Gemisch auf Eis, rührten kräftig und nutschten das ausgefallene Acetat ab. Nach DC-Überprüfung wie oben bestand das Acetat aus acht Substanzen. (37 mg)

V. Methylierungen

1. Veresterung mit Methanol/HCl (Carboxylgruppe)

Je 5 mg LSA und LSB, nach III/2/a getrennt, wurden in 25 ml trockenem Methanol gelöst, nach Einleiten von HCl-Gas 1/2 Stunde geschüttelt und anschließend eine Stunde auf 60° erwärmt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels nahmen wir in Äther auf und chromatographierten auf Kieselgelplatten (Laufmittel Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure 2:7:1). Neben dem größten Teil Ausgangsprodukt konnten wir nur eine schwache Zone einer zweiten Substanz identifizieren.

2. Methylierung mit Diazomethan

Wir lösten die Substanz LS in Äther oder Äther-Methanol 1:2 und methylierter nach der Methode von POHL, GLASL u. WAGNER ⁴⁰⁾, indem wir Diazomethan aus einem Gemisch von 1,5 g N-Methyl-N-nitroso-p-toluylsulfonamid (MNSA Merck) in 3 ml Äther, 3 ml 60 %iger KOH und 5 ml Glykolmonoäthyläther herstellten und mit Hilfe eines Stickstoffstromes in die Lösung der Substanz einleiteten. Das Ende der Methylierung kündigte sich durch Gelbfärbung der Lösung, hervorgerufen durch überschüssiges Diazomethan, an. Wir entfernten den Äther durch Abblasen mit Stickstoff und trennten das Pro-

dukt dünnstschichtchromatographisch auf Kieselgel/Benzol-Äthylacetat 6:5 (B/II/a). Es bestand aus sechs Substanzen.

3. Methylierung mit Dimethylsulfat

200 mg Substanz LS wurden in 40 ml wasserfreiem Aceton gelöst und 3 g frisch geglühtes Kaliumcarbonat zugegeben. In die Lösung tropfen wir 3 ml ^{frisch}destilliertes Dimethylsulfat und erhitzen 20 Stunden unter ständigem Rühren am Rückfluß (H_2O -Ausschluß). Die Lösung wurde heiß filtriert, der Rückstand mehrmals mit Aceton versetzt, unter Rühren am Rückfluß kurz erhitzt und filtriert. Die vereinigten Filtrate engten wir auf ca. 10 ml ein und gaben dieselbe Menge Wasser hinzu, schüttelten kräftig durch und zogen den Rest des Acetons im Rotationsverdampfer ab. Es schied sich ein gelber Sirup ab.

Wir dekantierten das Wasser, nahmen den Sirup in Chloroform auf und schüttelten die wäßrige Phase mit Chloroform aus. Die vereinigten Chloroformphasen wuschen wir peinlich säurefrei, zogen das Chloroform am Rotationsverdampfer ab und chromatographierten den entstandenen gelben Sirup auf Kieselgelplatten (B/II/a) mit dem Laufmittel Benzol-Äthylacetat 7:3 und erhielten neben zwei kräftig blau fluoreszierenden Substanzen (R_f 0,45 und 0,6) sechs weitere gelblich fluoreszierende Flecken.

E. Strukturaufklärung der Methylprodukte

I. Trennung der Lithospermsäure-Methylprodukte

Der bei der Methylierung mit Dimethylsulfat erhaltene Sirup (ca. 280 mg) wurde in ca. 5 ml Methanol-Wasser 75:25 gelöst und auf einer Polyamidsäule nach B/IV/3 aufgetragen. Wir eluierten mit Methanol-Wasser 75:25, fingen die ersten zwei

dunkelblaugrauen Zonen auf und entfernten das Elutionsmittel. Den erhaltenen gelblichen Sirup lösten wir in einigen ml Benzol-Äthylacetat 7:3 und tropften vorsichtig auf eine Kieselgelsäule nach B/IV/1 auf. Beim Eluieren mit Benzol-Äthylacetat 7:3 konnten wir unter UV-Licht eine Auftrennung in zwei kräftig blau fluoreszierende Zonen und einige gelbliche Zonen beobachten. Im Fraktionsschneider fingen wir 75 Fraktionen à 20 ml auf, chromatographierten auf Kieselgelplatten (Benzol-Äthylacetat 7:3) und vereinigten die entsprechenden gleichen Fraktionen. Die erste blau fluoreszierende Zone enthielt die Substanz MA (Heptamethyl-Lithospermsäure A), die zweite blaue Zone die Substanz MB (Nonamethyl-Lithospermsäure B).

Substanz MA

Schmp.: 55° C

opt. Drehung: $[\alpha]_D^{24} = + 118^\circ$ (c = 0,9 in Chloroform)

DC: Kieselgel/Benzol-Äthylacetat 7:3 Rf = 0,65

Polyamid/Methanol-Wasser 75:25 Rf = 0,8

Molekulargewicht: M^+ 636 (massenspektrometrisch)

$C_{34}H_{36}O_{12}$ (636,6) Ber.: C 64,5 % H 5,7 % OCH_3 24,2 %

Gef.: C 61,5 % H 5,3 % OCH_3 22,8 %

UV (Methanol p.a.): λ_{max} 228 nm ($\epsilon = 25500$); 253 nm ($\epsilon = 16000$); 286 nm ($\epsilon = 13500$); 305 nm ($\epsilon = 13000$); 335 nm ($\epsilon = 10000$).

IR (in KBr): OCH_3 : 2850 cm^{-1} ; CO-Ester: 1745, 1720, 1695 cm^{-1}

>C=C< (aromat.): 1595; 1500 cm^{-1}

$\begin{array}{c} H \quad H \\ | \quad | \\ -C=C- \end{array}$ (trans): 980 cm^{-1}

NMR-60 MHz ($CDCl_3$, TMS int.): (siehe Abb. Nr. 8 S. 30)

H- α_B : $\delta = 7,8$ ppm (d, $J=16\text{Hz}$); H-Ar A,B,C: $\delta = 7,3 - 6,7$
(m) 8H;
H- β_B : $\delta = 6,35$ ppm (d, $J=16\text{Hz}$); H- α_A : $\delta = 6,1$ ppm
(d, $J=6\text{Hz}$);
H- β_C : $\delta = 5,4$ ppm (m); H- β_A : $\delta = 4,5$ ppm
(d, $J=6\text{Hz}$);
-OCH₃-B: $\delta = 3,95$ ppm (s) 3H; -OCH₃-A,C: $\delta = 3,89$ ppm
(s) 12H;
-OCH₃-Ester A,C: $\delta = 3,78$ ppm (s) 6H; H- α_C : $\delta = 3,2$ ppm
(m) 2H;

Substanz MB

Schmp.: 55 - 57° C

opt. Drehung: $[\alpha]_D^{24} = + 76^\circ$ ($c = 1,1$ in Chloroform)

DC: Kieselgel/ Benzol-Äthylacetat 7:3 Rf = 0,5

Polyamid/ Methanol-Wasser 75:25 Rf = 0,7

Molekulargewicht: M^+ 844 (massenspektrometrisch)

C₄₅H₄₈O₆ (844,8) Ber.: C 64 % H 5,7 % OCH₃ 25,8 %

Gef.: C 59,5 % H 5,3 % OCH₃ 23,2 %

UV (Methanol p.a.): λ_{max} 230 nm ($\epsilon = 35000$); 255 nm
($\epsilon = 17000$); 286 nm ($\epsilon = 16700$);
305 nm ($\epsilon = 14000$); 335 nm
($\epsilon = 11500$).

IR (1n KBr): OCH₃: 2840 cm⁻¹; CO-Ester: 1740, 1725, 1695 cm⁻¹

>C=C< (aromat.): 1590, 1500 cm⁻¹

$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ | \quad | \\ -\text{C}=\text{C}- \end{array}$ (trans): 970 cm⁻¹

NMR-60 MHz (CDCl₃, TMS int.): (siehe Abb. Nr. 9 S. 31)

H- α_B : $\delta = 7,7$ ppm (d, $J=16$ Hz); H-Ar A,B,C,D: $\delta = 7,3-$
6,6 (m) 11H,

$\text{H-}\beta_{\text{B}}: \delta = 6,28 \text{ ppm (d, } J=16 \text{ Hz)}$; $\text{H-}\alpha_{\text{A}}: \delta = 6,1 \text{ ppm}$
 $(\text{d, } J=6 \text{ Hz})$;
 $\text{H-}\beta_{\text{C}}, \beta_{\text{D}}: \delta = 5,35 \text{ ppm (m) 2 H}$; $\text{H-}\beta_{\text{A}}: \delta = 4,5 \text{ ppm}$
 $(\text{d, } J=6 \text{ Hz})$;
 $-\text{OCH}_3\text{-Ar B: } \delta = 4,0 \text{ ppm (s) 3 H}$; $-\text{OCH}_3\text{-Ar A, C, D: } \delta = 3,9$
 ppm (s) 18 H ;
 $-\text{OCH}_3\text{-Ester C, D: } \delta = 3,76 \text{ ppm (s) 6H}$; $\text{H-}\alpha_{\text{C}}: \delta = 3,15 \text{ ppm}$
 $(\text{m) 4 H}$;

II. Katalytische Hydrolyse der Substanzen MA und MB mit Natriummethylat

20 mg der Substanz MA bzw. MB wurden in 1 ml Chloroform gelöst und mit 3 ml Methanol verdünnt. Wir setzten einige Tropfen 1 n Na-Methylatlösung hinzu und ließen das Ganze unter gelegentlichem Schütteln bei Zimmertemperatur fünf Stunden reagieren, wobei wir die Umsetzung DC-chromatographisch auf Kieselgelplatten/Benzol-Aceton 8:2 verfolgten. Nach fünf Stunden neutralisierten wir mit einer 1 %igen Lösung von Eisessig in Methanol, zentrifugierten vom gebildeten Niederschlag ab, engten zur Trockne ein, nahmen den Rückstand mit Chloroform p.a. auf und zentrifugierten vom Ungelösten ab. Nach Abdunsten des Lösungsmittels erhielten wir ein gelblich weißes Pulver, das sich DC-chromatographisch aus fünf Substanzen zusammensetzte. (Abb. Nr. 15 S. 47)

Dünnschichtchromatogramm:

Kieselgel Merck₆₀/ Benzol-Aceton 9:1

Zone	UV 365 nm	UV 254 nm
A: Rf = 0,13	schw. rötl.-violett	Fluoreszenzminderung
B: Rf = 0,28	stark " "	
C: Rf = 0,38	schwach blau	Fluoreszenzminderung
D: Rf = 0,6	stark blau	
E: Rf = 0,7	gelb	

III. Chromatographische Trennung und massenspektrometrische Untersuchung der Hydrolyseprodukte

Zur massenspektroskopischen Überprüfung chromatographierten wir das Hydrolysegemisch auf Kieselgel MH-Platten nach B III a im Laufmittelgemisch Benzol-Aceton 9:1, markierten die Zonen unter UV-Licht und schabten sie aus. Nach zweimaligem Eluieren mit Chloroform am Whirlimix zentrifugierten wir vom Kieselgel ab, engten auf ca. 1 Tr. ein und gaben diesen in einen Tiegel des Massenspektrometers.

Aus Zone D, Rf = 0,6, (siehe Abb. Nr. 15 S. 47) erhielten wir eine Substanz mit dem Molekülpeak M^+ 428 (50 %). Intensive Fragmentionen: m/e 396 (28 %), m/e 368 (34 %), m/e 337 (100 %), m/e 181 (10 %), m/e 151 (32 %).

Zone B, Rf = 0,28 stellte ein Gemisch zweier Substanzen dar. Neben einem Molekülpeak (Temp. Ionenquelle 90°) des 3-,4-Dimethoxy- β -phenylmilchsäureME bei m/e 240 mit Fragmentationen m/e 222, m/e 181, m/e 151, m/e 135, m/e 107, m/e 91, m/e 77 erhielten wir bei höherer Ionenquellentemperatur, ca. 200°, einen Peak bei m/e 444 mit den Fragmentationen m/e 428; m/e 396; m/e 368; m/e 337.

Die Spektren der Zonen A, C und E konnten wir nicht interpretieren.

IV. Umsetzung der Hydrolyseprodukte mit 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid

Wir lösten 20 ml des Reagenzes in 5 ml Benzol, trennten vom nicht Gelösten ab und versetzten die rote Lösung mit 20 mg Hydrolysegemisch. Zu dieser Mischung gaben wir einen Tropfen Pyridin, schüttelten 24 Stunden auf der Schüttelmaschine und ließen 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Der abgeschiedene rote Niederschlag wurde abgenutscht und das Filtrat chromatographiert.

DC: Kieselgel HF (Benzol-Aceton 9:1): Auftrennung in acht Zonen (Abb. Nr. 16 S. 50).

Nach dünnstichtchromatographischer Trennung konnten wir massenspektrometrisch die Zonen wie folgt identifizieren:

Zone D:	Rf = 0,57	Substanz 428	M ⁺ 428
Zone B:	Rf = 0,28	Substanz 240	M ⁺ 240
Zone I:	Rf = 0,48	Substanz 470	M ⁺ 470
Zone II:	Rf = 0,77	Reaktionsprodukt aus eingesetztem Reagens mit Substanz 240 M ⁺ 493.	

V. Präparative DC-Trennung der Substanzen 428 und 240

Jeweils ca. 5 - 7 mg Hydrolysegemisch wurden strichförmig auf eine Kieselgelplatte Merck₆₀ HF (B/III/2) aufgetragen und im Laufmittel Dichlormethan-Chloroform-Äthylacetat-Propanol (45:45:4,5:4,5) entwickelt. Unter UV-Licht markierten wir die Zonen B und D, kratzten das Kieselgel ab, sammelten es in einem Soxhlet und eluierten mit Chloroform

p.a.. Nach Entfernung des Lösungsmittels trockneten wir scharf über Diphosphorpentoxid.

Substanz 240:

Schmp.: 163°

DC: Kieselgel₆₀/ Benzol-Aceton 9:1, Rf = 0,28

Dichlormethan-Chloroform-Äthylacetat-Propanol

45:45:4,5:4,5; Rf = 0,55

Molekulargewicht: M⁺• 240 (massenspektrometrisch)

C₁₂H₁₆O₅ (240,2) Ber.: C 60,0 % H 6,7 %

Gef.: C 58,5 % H 6,4 %

UV (Methanol p.a.): λ_{max.} 230 nm (ε = 8000), 280 nm (ε = 2800).

IR (in KBr): OH: 3200 cm⁻¹; OCH₃: 2900 cm⁻¹; CO: 1710 cm⁻¹

NMR-100 MHz (CDCl₃, TMS int.): (siehe Abb. Nr. 21 S. 59)

H-Ar: δ = 6,78 (s) 3H;

H-α: = 4,45 (m) 1H;

-OCH₃-Ar: δ = 3,88 (s) 6H;

-OCH₃-Ester: δ = 3,8 (s) 3H;

H-β: δ = ca. 3,0 (m) 2H;

OH: δ = 2,75 (s. br.) 1H;

Substanz 428

Schmp.: 132°

DC: Kieselgel / Benzol-Aceton 9:1, Rf = 0,6

Dichlormethan-Chloroform-Äthylacetat-Propanol

45:45:4,5:4,5; Rf = 0,8

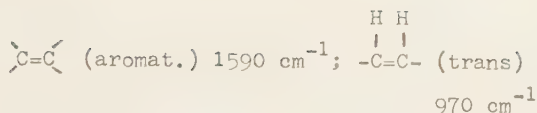
Molekulargewicht: M⁺• 428 (massenspektrometrisch)

C₂₃H₂₄O₈ (428,4) Ber.: C 64,5 % H 5,6 %

Gef.: C 62,0 % H 5,1 %

UV (Methanol p.a.): λ_{max.} 237 nm (ε = 18500); 287 nm (ε = 12000); 300 nm (ε = 11500)
322 nm (ε = 9600).

IR (in KBr): OCH₃: 2850 cm⁻¹; CO: 1730, 1700 cm⁻¹



NMR-100 MHz (CDCl₃ TMS int.): siehe Abb. Nr. 23 S. 61

H- α_B : δ = 7,7 ppm (d; J = 16Hz); H-B2: δ = 7,2 ppm (d; J=9Hz);
H-Ar A, B: δ = 7,0-6,7 (m) 4H; H- β_B : δ = 6,28 ppm (d; J=16Hz);
H- α_A : δ = 6,03 ppm (d; J=6Hz); H- β_A : δ = 4,48 ppm (d; J=6Hz);
-OCH₃-ArB: δ = 3,95 ppm (s) 3H; -OCH₃-ArA: δ = 3,87 ppm (s) 6H;
-OCH₃-Ester A,B: δ = 3,8 ppm (s) 6H;

F. Isolierung und Darstellung von Vergleichssubstanzen

I. Isolierung der Rosmarinsäure

2 Kg Blattmaterial von Rosmarinus officinalis extrahierten wir zur Entfettung und Entfernung eines Teils des Chlorophylls am Soxhlet mit Petroläther. Anschließend extrahierten wir mit Methanol und zogen das Lösungsmittel ab. Der schmierige Rückstand wurde mit insgesamt 3 l warmem Wasser in kleinen Anteilen unter ständigem Rühren extrahiert und nach dem Erkalten zum Absetzen des Chlorophylls stehen gelassen. Den wäßrigen Auszug engten wir auf ca. 300 ml ein, säuerten schwach an und zogen 24 Stunden mit Äther aus, wobei wir die Vorlage des Perforators mit dem Extraktionsgut mehrmals wechselten. Die Ätherphase wurde zur Trockne eingeeengt, mit Polyamid verrieben und auf einer 60 cm langen Polyamid-Säule (B/IV/3) mit 2 %iger Essigsäure eluiert. Wir verwarfen die ersten beiden blau fluoreszierenden Zonen und fingen das folgende Eluat im Fraktionsschneider in 20 ml-

Fractionen auf. Nach DC (B/II/1/a) mit Vergleichssubstanz vereinigten wir die entsprechenden Fraktionen, entfernten das Elutionsmittel, lösten in kaltem Wasser und kristallisierten aus eiskaltem Wasser aus. Ausbeute 280 mg.

Schmp.: 195°C (Lit. Schmp. 28°) = 204°)

DC: Kieselgel / Toluol-Äthylformiat-Ameisensäure (2:7:1)

$R_f = 0,65$ stark blau fluoreszierend.

II. Methylierung der Phenylmilchsäure

100 mg Phenylmilchsäure (puriss. Fa. Schuchard) wurden in ca. 3 ml Methanol gelöst und mit 15 ml Äther versetzt. Wir methylierten mit Diazomethan nach D/V/2 bis zur Gelofärbung und reinigten nach Entfernen des Lösungsmittels die Substanz über eine Kieselgelsäule (B IV/1) mit Benzol-Aceton.

DC: Kieselgel / Benzol-Aceton 9:1 $R_f = 0,6$

NMR-60 MHz ($\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$, TMS int.):

H-Ar: $\delta = 7,15$ ppm (s) 5H; H- α : $\delta = 4,3$ ppm (q,
J=6Hz; 7,5Hz);

-OCH₃: $\delta = 3,6$ ppm (s) 3H; H- β : $\delta = \text{ca. } 2,9$ ppm (m) 2H;

Molekulargewicht: $M^{+} \cdot 180$ (massenspektrometrisch)

Fragmentationen: m/e 180 (M; 7 %) m/e 162 (100 %) m/e 131
(47 %) m/e 121 (63 %) m/e 103 (65 %) m/e 91
(98 %) m/e 77 (40 %) m/e 65 (53 %) m/e 51
(32 %) m/e 39 (30 %)

III. Acetylierung des Phenylmilchsäuremethylesters

100 mg PhenylmilchsäureME versetzten wir mit 100 mg geglühtem Na-Acetat und 1 ml Acetanhydrid, erhitzen das Gemisch 1/2 Stunde am Dampfbad und ließen fünf Stunden bei Zimmer-

temp. stehen. Anschließend gossen wir das Reaktionsprodukt auf 10 ml Eiswasser und rührten kräftig. Es schied sich ein zähflüssiges Öl ab. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank dekantierten wir die wäßrige Phase u. schüttelten sie mit Chloroform aus. Nach DC-Prüfung auf Kieselgelplatten / Laufmittel Benzol-Aceton 9:1 vereinigten wir die Chloroformphase mit dem abgeschiedenen Öl und reinigten das Acetat säulenchromatographisch über eine Kieselgelsäule (B/IV/1) 2 x 15 cm, Elutionsmittel: Benzol-Aceton 9:1, Tropfgeschwindigkeit 9 Tr./Min.. Wir verfolgten die Trennung unter dem UV-Licht und fingen die dunkelblau fluoreszierende Fraktion auf.

DC: Benzol-Aceton 9:1 $R_f = 0,68$

Molekulargewicht: M^+ 221 (M-1) (5 %)

Fragmentionen: m/e 191 (35 %), m/e 162 (100 %), m/e 131 (80 %), m/e 103 (40 %), m/e 91 (65 %), m/e 77 (30 %), m/e 43 (80 %).

IV. Umsetzung von Phenylmilchsäuremethylester mit 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid

250 mg PhenylmilchsäureME lösten wir in 5 ml Benzol, vereinigten mit einer Lösung von 400 mg 4'-Nitroazobenzol-carbonsäure-(4)-chlorid in 45 ml Benzol und gaben 800 mg Pyridin hinzu, Das Gemisch schüttelten wir 1/2 Stunde und ließen 20 Stunden bei Zimmertemp. stehen. Mit 20 ml einer Mischung aus Äther-Benzol 1:1 spülten wir den Ansatz in einen Scheidetrichter und schüttelten mehrere Male mit einer Mischung aus 100 ml Wasser und 50 ml n H_2SO_4 kräftig durch. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, die Lösung mit Wasser säurefrei gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und auf 10 ml eingeengt. Wir gaben die 10 ml auf eine Säule,gefüllt mit 20 g neutr. Aluminiumoxid, Aktivi-

tätsstufe III, und eluierten mit Benzol-Cyclohexan 1:1. Wir fingen eine orangerote Zone auf, während ein Teil des Reaktionsproduktes am Startpunkt sitzen blieb. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Benzol-Hexan konnten wir kein, im NMR-Spektrum einheitliches Produkt gewinnen.

V. Darstellung des Ferulasäuremethylesters

250 mg Ferulasäure (Fa. Schuchard) wurden in 1 ml Methanol und 10 ml Äther gelöst und nach D/V/2 mit Diazomethan methyliert. Nach DC-Überprüfung (B/II/1/a) und Besprühen mit diazotierter Sulfanilsäurelösung erhielten wir neben dem Methylester ein Permethylprodukt, das wir auf einer Kieselgelsäule (B/IV/1) mit dem Laufmittel Benzol-aceton 9:1 abtrennten.

VI. Darstellung des Dehydrodiferulasäuredimethylesters

180 mg nach F/V erhaltener Ferulasäuremethylester wurde in einer Mischung aus 750 ml Äthanol und 750 ml Wasser gelöst, die 0,2 mg krist. Peroxidase-(Fa. Boeringer) enthielt. Innerhalb von 24 Stunden wurden unter ständigem Rühren 1000 ml einer 0,02 %igen Lösung von Hydroperoxid tropfenweise zugegeben. Nach 6 und 12 Stunden fügten wir jeweils 0,75 ml einer 0,02 %igen Peroxidase-Lösung zu. Nach 24 Stunden brachen wir die Reaktion ab und engten die leicht bräunliche Lösung am Rotationsverdampfer auf ca. 200 ml ein. Das ausgefallene Material nahmen wir mit Essigester auf, sättigten die Lösung mit Kochsalz und schüttelten mehrmals mit Äthylacetone aus. Die vereinigten Äthylacetatauszüge engten wir unter N_2 -Atmosphäre im Vakuum zur Trockne ein und gaben das Pulver auf eine Kieselgelsäule 4,5 x 40 cm, die wir mit Benzol-Aceton 9:1 eluierten. Die erste vorauslaufende Zone enthielt das Dimerprodukt. Ausbeute 75 mg.

Wir kristallisierten aus Essigester-Cyclohexan um.

Schmp.: 142° C

Molekulargewicht: M^+ 414 (massenspektrometr.)

UV (Methanol p.a.): $\lambda_{\max}$. 223, 290, 305, 328 nm

NMR-60 MHz ($CDCl_3$, TMS int.): (siehe Abb. Nr. 27 S. 68)

H- α_B : δ = 7,68 ppm (d, J=16 Hz); H-Ar A,B: δ = 7,3-6,7
ppm (m) 5H;

H- β_B : δ = 6,32 ppm (d, J=16 Hz); H- α_A : δ = 6,13 ppm
(d, J=8 Hz);

H- β_A : δ = 4,35 ppm (d, J= 8 Hz); $-OCH_3$: δ = 4,0-3,75 ppm
(m) 12 H;

G. CD-Messungen

Die Messungen wurden am Institut f. Strukturchemie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Wir danken Herrn Prof. Dr. G. Snatzke für die Daten und die Hinweise für die Interpretation.

Lösungsmittel: Acetonitril

Substanz MA: 327 (+ 1.69), 286 (+ 2.38), 250 (+ 8.99), 223
(+ 1.0), 204 (- 7.5)

Substanz 428: 314 (+ 2.05), 285 (+ 2.13), 248 (+ 12.72),
223 (+ 1.3), 204 (- 15), 187 (- 14).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) P. TRAIN, J.R. HENRICHS u. W.A. ARCHER, "Medicinal Uses of Plants by Indian Tribes of Nevada", Division of Plant Industry, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C. Dec. 1941, Part II, Seite 102
- 2) E.M. CRANSTON, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 83, 130 (1945)
- 3) P. ZAHL, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 67, 405 (1947)
- 4) R.L. NOBLE, E.R. PLUNKETT u. N.B.G. TAYLOR, "Recent Progress in Hormone Research", edited by G. Pincus, Academic Press, New York 1950, Bd. V, Seite 263
- 5) F. KEMPER, Arzneimittelforsch. 9, 368 u. 411 (1959)
- 6) R.L. NOBLE, E.R. PLUNKETT u. R.C. GRAHAM, Federation Proc. 10, 97 (1951)
- 7) R.L. NOBLE, E.R. PLUNKETT u. R.C. GRAHAM, J. Endocrinol. 10, 212 (1954)
- 8) A. LOESER u. K. MIKULICZ, Klin. Wochenschr. 33, 531, 538, 730, 1017 (1955)
- 9) A. LOESER, K. MIKULICZ u. K. RITTER, Acta Endocrinol. 20, 293 (1955)
- 10) A. LOESER, K. MIKULICZ u. K. OPITZ, Klin. Wochenschr. 34, 446 (1956)
- 11) F. KEMPER, A. LOESER u. A. RICHTER, Arzneimittelforsch. 12, 1 (1962)
- 12) G. JOHNSON, S.G. SUNDERWIRTH, H. GIBIAN, A.W. COULTER u. F.X. GASSNER, Phytochemistry 2, 145 (1963)
- 13) F.X. GASSNER, E. JÜCHLE, G. JOHNSON, M.L. HOPWOOD u. S.G. SUNDERWIRTH, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 114, 20 (1963)
- 14) R. SCHMIECHEN, H. GIBIAN, Liebig's Ann. Chem. 665, 68 (1963)
- 15) F. KEMPER, A. LOESER, K. OPITZ u. G. SCHWARZ, Arch. intern. pharmacodynamic 108, 200 (1956)
- 16) a) H. WAGNER, L. HÖRHAMMER u. U. FRANK, Arzneim. Forsch. 20, 705-713 (1970)
b) U. FRANK, Dissertation München 1967
- 17) W.R. BRENNEMAN u. M. CARMACK, Endocrinology 62, 627 (1956)
- 18) W.R. BRENNEMAN, M. CARMACK, D.E. OVERACK, R.O. CREEK u. R. SHAW, Endocrinology 67, 583 (1960)
- 19) C. CHARAUX, Bull. Soc. Chim. Biol. 6, 641 (1924)
- 20) V. PLOUVIER, C.R. hebdom. Séances Acad. Sci. 247, 2190 (1958)
- 21) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. H. KÖNIG, Arzneim. Forsch. 14, 34 (1964)
- 22) H.W. KÖNIG, Dissertation München 1962
- 23) K. HERRMANN, Pharm. Zentralhalle 95, 56 (1956)
- 24) J. CORSE, R.E. LUNDIN u. A.C. WAISS, Phytochemistry 4, 527 (1965)

- 25) M.L. SCARPATI u. M. GUIISO, Tetrahedron L. 39, 2851 (1964)
- 26) K. HERRMANN, Pharmazie 11, 433 (1956)
- 27) R.F. PATTERSON u. H. HIEBERT, J. Americ. chem. soc. 65, 1862 (1943)
- 28) M.L. SCARPATI u. G. ORIENTE, Ricerca sci. 28, 2329 (1958)
- 29) K. HERRMANN, Arch. Pharm. 65, 1043 (1960)
- 30) L. JURD, Arch. Biochem. Biophys. 66, 284 (1957)
- 31) H. BÜHME u. Th. SEVERIN, Arch. Pharm. 62, 285 (1957)
- 32) J. CORSE, R.E. LUNDIN, E. SONDHEIMER u. C.A. WAISS jr., Phytochemistry 5, 767 (1966)
- 33) F. GSTIRNER u. E. SCHIEMENZ, Sci. Pharm. 37, 40 (1969)
- 34) L.F. WIGGINS u. J.H. WILLIAMS, Nature 170, 279 (1952)
- 35) R. NEU, Naturwissenschaften 45, 286 (1958)
- 36) K. RAUSCHER, J. VOIGT u. W. SCHMIDT, Pharm. Zentralhal-
le 98, 553 (1959)
- 37) K. HERRMANN, Pharmazie 13, 268 (1958)
- 38) M.L. SCARPATI u. M. GUIISO, Ann. Chim. (Rome) 53, 1315 (1963)
- 39) P. POHL, H. GLASL u. H. WAGNER, J. of Chromatogr. 42, 75 (1969)
- 40) H. v. PECHMANN, Chem. Ber. 28, 855 (1895)
- 41) J. HERZIG u. F. WENZEL, Monatsh. Chem. 24, 889 (1903)
- 42) M.C. CASERIA, J.D. ROBERTS, M. NEWMAN u. W.S. JOHNSON, J. Am. chem. soc. 80, 2548 (1958)
- 43) M. CATES, J. Am. Chem. Soc. 72, 231 (1950)
- 44) A.C. MEHTA u. T.R. SESHADRI, J. Chem. Soc. 3823 (1954)
- 45) L. CLAISEN u. O. EISLEB, Ann. Chem. 401, 29 (1913)
- 46) H. KIENITZ, Massenspektrometrie, Verlag Chemie 1968
- 47) F.W. Mac LAFFERTY, "Determination of Organic Structures by Physical Methods" Vol. 2, F.C. Nachod and W.D. Phillips, Ed., Academic Press New York 1961
- 48) S. MEYERSON, Appl. Spectroscopy 2, 120 (1955)
- 49) V. KOVACIK, J. SKAMLA, D. JONIAK u. B. KOSIKOVA, Chem. Ber. 102, 1513 / 102, 3623 (1969)
- 50) G. SPITELLER, Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- 51) Mac LAFFERTY, Ann. Chem. 28, 306 (1956)
- 52) G. ZEMPLÉN u. E. PASCU, Berichte 62, 1613 (1929)
- 53) K. FREUDENBERG u. G. HÜLL, Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 237 (1941)
- 54) Th. LENNARTZ, Chem. Ber. 76, 248 (1943)
- 55) R.L. SHRINER u. R.C. FUSON, Ident. of Org. Compounds. Wiley & Sons, New York 1948
- 56) A. BUTENANT, R. BECKMANN u. E. HECKER, Hoppe-Seyler's physiol. chem. 324, 71 (1961)
- 57) E. HECKER, Chem. Ber. 88, 1666 (1955)
- 58) C.S. BARNES u. J.L. OCCOLOWITZ, Austral. J. Chem. 16, 219 (1963)

- 59) H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI u. D.H. WILLIAMS, Interpretation of mass spectra of organic Compounds, Holden Day, San Francisco, 1964
- 60) Z. PELAH, J.M. WILSON, M. OHASHI, H. BUDZIKIEWICZ u. C. DJERASSI, Tetrahedron 19, 2233 (1963)
- 61) E. STAHL u. H. JORK, in: Dünnschichtchrom. E. STAHL, S. 224 Springer Verl. Berlin-Heidelberg-New York 1967
- 62) N.J. CARTWRIGHT u. R. HAWORTH, J. Chem. Soc. 535 (1944)
- 63) K. FREUDENBERG u. H. RICHTZENHAIN, Chem. Ber. 76, 997 (1943)
- 64) K. FREUDENBERG u. G. SCHUHMACHER, Chem. Ber. 87, 1882 (1954)
- 65) H. NIMZ, K. NAYA u. K. FREUDENBERG, Chem. Ber. 96, 2086 (1963)
- 66) E.M. EMERY, Ann. Chem. 32, 1495 (1960)
- 67) C.H. LUDWIG, B.J. NIST u. J.L. Mac CARTHY, J. Am. Chem. Soc. 86, 1186 (1963)
- 68) G. AULIN-ERDMAN u. Y. TOMITA, Acta Chem. Scand. 17, 535 (1963)
- 69) Varian Katalog Nr. 251
- 70) LUSTIG (Privatmitteilungen) Varian Katalog Nr. 229
- 71) K. MISLOW, Einführung in die Stereochemie, Verlag Chemie 1967
- 72) G. SNATZKE, ORD and CD in Organic Chemistry, Heyden and Son Ltd., London 1967
- 73) C.J. PEW, J. Am. Chem. Soc. 74, 2850 (1952)
- 74) H.P. HÖRHAMMER, Dissertation München 1966
- 75) K. FINK u. R.M. FINK, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 70 654 (1949)
- 76) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. K. HEIN, J. Chromatog. 13, 235 (1964)
- 77) R. NEU u. P. HAGEDORN, Naturwissenschaften 40, 411 (1953)
- 78) H. REZNIK u. K. EGGER, Z. anal. Chem. 183, 196 (1961)
- 79) R. NEU, Naturwissenschaften 44, 181 (1957)
- 80) H. JATZKEWITZ u. U. LENZ, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 305, 53 (1956)
- 81) H.G. BRAY, V.W. THORPE u. K. WHITE, Biochem. J. 46, 271 (1950)

LEBENS LAUF

=====

18. Dez. 1941	Dieter Wittmann geb. in Lychen/Brandenburg Eltern: Dr.med Hans Wittmann Herta Wittmann, geb. Schäfer
Dez. 1945	Übersiedlung nach Bamberg
1947 - 1961	Schulausbildung in Bamberg an der Luitpoldschule und der Oberrealschule
19. Juli 1961	Reifeprüfung
1. Okt. 1961 -	Apothekenpraktikum in der Apotheke des
30. Sept. 1963	Städt. Krankenhauses Bamberg und in der Schwanenapotheke Bamberg
23. Aug. 1963	Pharmazeutisches Vorexamen in Bayreuth
1963 - 1965	Studium der Pharmazie in Bamberg
1965 - 1967	Studium der Pharmazie in Tübingen
18. April 1967	Pharmazeutisches Staatsexamen in Tübingen
Mai 1967 -	Kandidatenzeit in der Luitpold-Apotheke
Jan. 1968	in Landshut
1. Febr. 1968	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit am Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München Anleitung: Professor Dr. H. Wagner
23. Juni 1968	Pharmazeutische Approbation
18. März 1970	Verehelichung mit Barbara Wittmann-Rechl geb. Rechl
Dez. 1972 -	Wehrdienst
März 1973	
1. Dez. 1970 -	Gewährung eines Promotionsstipendiums
August 1973	nach dem Graduiertenförderungsgesetz

